

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique Université  
Mouloud Mammeri Tizi-Ouzou**

**Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques**

**Département de Biochimie - Microbiologie**



*Mémoire de fin d'études*

*En vue de l'obtention du diplôme de Master*

*Spécialité : Biotechnologie Microbienne*

*Thème*

*Evaluation de l'activité antimicrobienne et de la capacité  
de production enzymatique des Actinomycètes*

**Travail réalisé par :**

**Soutenu le: 19-09-2016 M<sup>elle</sup>: BAKDI KATIA**

**M<sup>r</sup>: LOUNISAHMED**

**Jury de soutenance:**

**Président : M<sup>r</sup> TAZDAIT D. Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Promoteur : M<sup>r</sup> OUELHADJ A. Maitre de conférences A à l'UMMTO**

**Examineur : M<sup>me</sup> TAZDAIT R. Maitre de conférences B à l'UMMTO**

**Examineur : M<sup>me</sup> BENAZOUZ K. Maitre Assistante A à l'UMMTO**

**Année universitaire : 2015-2016**

## **Remerciements**

*Nous tenons à remercier en premier lieu le bon Dieu de nous avoir donnés la santé, la volonté, la foi et le courage pour réaliser ce travail.*

*Nous tenons à remercier:*

*Profondément, notre encadreur : **Monsieur OUELHADJ. A : Maitre de conférences A à l'UMMTO** pour le privilège et la confiance qu'il nous a accordés durant l'étude pratique, , pour avoir accepté de diriger notre travail avec compétence, pour sa disponibilité, son aide, sa patience, ainsi que pour ses précieux conseils.*

- ***Monsieur TAZDAIT D. Maitre de conférences B à L'UMMTO,** pour avoir accepté de présider le jury.*
- ***Madame TAZDAIT R. Maitre de conférences B à L'UMMTO,** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*
- ***M<sup>e</sup> BENAZOUZ K. Mitre Assistante A à L'UMMTO,** pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

*Ainsi que toute personne ayant participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.*

## Liste des abréviations

**ATCC:** American Type Culture Collection

**MH :** Mueller- Hinton

**pH:** potentiel Hydrogène

**DO:** Densité Optique

**GC :** Guanine-Cytosine

**ADN :** Acide DésoxyriboNucléique

**G:** Grossissement

**PCR:** Réaction de Polymérisation en Chaîne

**RAPD-PCR:** Random Amplified Polymorphic DNA - Polymerase Chain Reaction

**ANOVA :** Analyse de la variance.

**Tm:** Température ambiante

**EB:** Extrait brut

**MEVAG:** Milieu d'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides

**ONPG:** L'Orthonitrophényl-β-galactoside

**RM:** Rouge de Méthyle

**VP:** Voges Proskauer

**NR:** Nitrate Réductase

**H<sub>2</sub>S:** Sulfure d'hydrogène

## Index des tableaux

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
<b>Tableau 1</b>	La classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S.	<b>4</b>
<b>Tableau 2</b>	Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (GOODFELLOW <i>et al.</i> , 1983).	<b>5</b>
<b>Tableau 3</b>	Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (WILLIAMS <i>et al.</i> , 1989).	<b>11</b>
<b>Tableau 4</b>	Spécificités des techniques moléculaires appliquées à la taxonomie des <i>Streptomyces</i> (Anderson et WELLINGTON, 2001).	<b>12</b>
<b>Tableau 5</b>	Nombre de souches d'actinomycètes produisant des métabolites bioactifs (BERDY, 2005).	<b>14</b>
<b>Tableau 6</b>	Les différentes classes d'antifongiques (TULKENS, 2008).	<b>24</b>
<b>Tableau 7</b>	Exemples d'antibiotiques produits par des actinomycètes.	<b>27</b>
<b>Tableau 8</b>	Produits chimiques et milieux de culture utilisés	<b>29</b>
<b>Tableau 9</b>	Les différentes souches microbiennes utilisées	<b>31</b>
<b>Tableau 10</b>	Tableau synthétique des différents caractères macromorphologiques des 5 souches d'actinomycètes	<b>46</b>
<b>Tableau 11</b>	Diamètre des zones d'inhibition (mm) des souches d'actinomycètes contre les germes cibles.	<b>51</b>
<b>Tableau 12</b>	Diamètres des zones d'inhibition obtenues en mm vis à vis des champignons cibles.	<b>57</b>
<b>Tableau 13</b>	Biodiversité métabolique des souches d'actinomycètes (+ positif; – négatif).	<b>94</b>
<b>Tableau 14</b>	Tableau synthétique de quelques caractères biochimiques des deux souches cibles.	<b>97</b>
<b>Tableau 15</b>	Résultats des tests de sensibilité des souches SP22 et SP23 vis-à-vis de quelques antibiotiques.	<b>100</b>

## Index des figures

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
<b>Figure 01</b>	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés.	<b>06</b>
<b>Figure 02</b>	Cycle du développement de <i>Streptomyces griseus</i> .	<b>08</b>
<b>Figure 03</b>	Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques.	<b>21</b>
<b>Figure 04</b>	Protocole d'extraction à partir du culot.	<b>36</b>
<b>Figure 05</b>	Protocole d'extraction des produits actifs à partir du surnageant de culture.	<b>37</b>
<b>Figure 06</b>	Photos des cinq souches d'actinomycètes sur les milieux Bennett observés à l'œil nu.	<b>47</b>
<b>Figure 07</b>	Les souches d'actinomycètes observées sous microscope optique au grossissement (G×10).	<b>48</b>
<b>Figure 08</b>	Observation microscopique des frottis d'actinomycètes (G×100).	<b>49</b>
<b>Figure 09</b>	Résultats de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes vis-à-vis des bactéries cibles (zones d'inhibition en mm).	<b>52</b>
<b>Figure 10</b>	Résultats de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes cibles vis-à-vis d' <i>Aspergillus niger</i> et <i>Candida albicans</i> .	<b>58</b>
<b>Figure 11</b>	Cinétique de croissance des souches SP22 et SP23.	<b>61</b>
<b>Figure 12</b>	Cinétique de production des molécules bioactives de la souche SP22.	<b>63</b>
<b>Figure 13</b>	Cinétique de production des molécules bioactives de la souche SP23.	<b>64</b>
<b>Figure 14</b>	Résultat de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des souches SP22 et SP23 vis-à-vis des mêmes cibles.	<b>67</b>
<b>Figure 15</b>	Sensibilité des bactéries cibles vis-à-vis des différents extraits organiques (Acétate d'éthyle) de la souche SP22.	<b>68</b>
<b>Figure 16</b>	Sensibilité des bactéries cibles vis-à-vis des différents extraits organiques (Acétate d'éthyle et n-hexane) de la souche SP23.	<b>69</b>
<b>Figure 17</b>	Activité antibiotique des extraits organiques de la souche SP22 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis des champignons cibles.	<b>72</b>

<b>Figure 18</b>	Activité antibiotique des extraits organiques de la souche SP23 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis des champignons cibles.	<b>73</b>
<b>Figure 19</b>	Acitivité de l'extrait acétique de la souche SP22 vis-à-vis des bactéries cibles en fonction du pH.	<b>75</b>
<b>Figure 20</b>	Acitivité de l'extrait acétique de la souche SP23 vis-à-vis des bactéries cibles en foction du pH.	<b>76</b>
<b>Figure 21</b>	Acitivité de l'extrait acétique de la souche SP22 vis-à-vis des bactéries cibles en fenction de la température.	<b>77</b>
<b>Figure 22</b>	Acitivité de l'extrait acétique de la souche SP23 vis-à-vis des bactéries cibles en fenction de la température.	<b>78</b>
<b>Figure 23</b>	Diamètre des zones d'inhibitions obtenues avec l'extrait acétique de la souche SP23 à différentes températures vis-à-vis d' <i>E.coli</i> (zones d'inhibition en mm).	<b>90</b>
<b>Figure 24</b>	Résultats de l'action des souches d'actinomycètes étudiées sur le lait écrémé. (R'13=SP20,R'15=SP22,R'16=SP23,R'17=SP24,R'20=SP27, T=témoin négatif).	<b>95</b>
<b>Figure 25</b>	Hydrolyse de l'amidon par les différentes souches d'actinomycètes (A+ = hydrolyse, A- =absence de l'hydrolyse).	<b>96</b>
<b>Figure 26</b>	Résultats de la dégradation de la caséine par les souches SP20 et SP23 (dégradation(+),absence de dégradation(-)).	<b>96</b>

# Sommaire

---

Résumé	
Liste des abréviations	
Index des tableaux et des figures	
Introduction .....	1

## PARTIE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE

### Chapitre 1: Les actinomycètes

1.1.Définition.....	3
1.2.Taxonomie .....	3
1.3. Les principaux caractères des actinomycètes .....	5
1.3.1 Habitat .....	5
1.3.2 Morphologie .....	5
1.3.3.Physiologie et Métabolisme .....	6
1.3.4. Cycle de développement des actinomycètes .....	7
1.3.5.Matériel génétique .....	8
1.4.Critères d'identification des actinomycètes.....	8
1.4.1. Critères morphologiques .....	8
1.4.2. Critères physiologique .....	9
1.4.3. Critères biochimiques .....	9
1.4.3.1. Composition en acides aminés .....	9
1.4.3.2. Composition en sucres.....	10
1.4.3.3. Composition en lipides .....	10
1.4.4. Critères moléculaires .....	10
1.4.4.1. Composition en GC% .....	10
1.4.4.2 Hybridations ADN-ADN.....	11
1.4.4.3. Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (LFRFA) .....	12
1.4.4.4. Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD-PCR.....	12
1.4.4.5. Séquençage de l'ADN ribosomique .....	13
1.5. Intérêts des actinomycètes .....	13
1.5.1. Pharmaceutiques .....	13
1.5.2. Agronomiques .....	14

### Chapitre 2: Les antibiotiques et les antifongiques

2.1.Les antibiotiques.....	16
----------------------------	----

## Sommaire

---

2.1.1. Définition.....	16
2.1.2. Classification .....	16
2.1.2.1. Familles des $\beta$ -lactamines.....	16
2.1.2.1.1. Les pénicillines .....	17
2.1.2.2. Famille des céphalosporines .....	17
2.1.2.3. Famille des aminosides.....	18
2.1.2.4. Famille des phénicoles .....	18
2.1.2.5. Famille des tétracyclines .....	18
2.1.2.6. Les macrolides .....	19
2.1.2.7. Les quinolones .....	19
2.1.2.8. Les polypeptides .....	19
2.1.3. Mécanisme d'action de l'antibiotique .....	19
2.1.3.1. Action sur la synthèse de la paroi bactérienne .....	20
2.1.3.2. Action sur la membrane cellulaire.....	21
2.1.3.3. Action sur la synthèse des acides nucléiques .....	21
2.1.4. Résistances aux antibiotiques .....	23
2.1.4.1. Les types de résistance .....	23
2.1.4.1.1. Résistance naturelle .....	23
2.1.4.1.2. Résistance acquise .....	23
2.2. Les antifongiques.....	24
2.2.1. Définition.....	24
2.2.2. Classification .....	24
 <b>Chapitre 3 : Les différents types de substances bioactives produites par les actinomycètes</b>	
3.1. Les antibiotiques.....	26
3.1.1. Le mécanisme de production des antibiotiques par les actinomycètes .....	27
3.2. Les enzymes .....	27

## Sommaire

---

3.3. Les bio insecticides et les bio pesticides .....	28
---	----

### **PARTIE 2 : PARTIE EXPÉRIMENTALE**

#### **Chapitre 1 : Matériel et méthode**

1.1. Matériel.....	29
1.1.1. Appareillage .....	29
1.1.2. Matériel du laboratoire .....	29
1.1.3. Souches microbiennes utilisées .....	31
1.2. Méthode .....	31
1.2.1. Présentation des cinq souches d'actinomycètes .....	31
1.2.1.1. Etudes morphologiques des souches .....	32
1.2.1.2. Préparation des frottis .....	32
1.2.1.3. Coloration de Gram .....	32
1.2.2. Criblage de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar.....	33
1.2.2.1. Standardisation de l'inoculum .....	33
1.2.2.2. Technique des cylindres d'agar .....	33
1.2.2.3. Criblage de l'activité antifongique .....	33
1.2.3. Cinétique de croissance et suivi de la production de métabolites bioactives.....	34
1.2.3.1. Culture des souches dans milieu liquide.....	34
1.2.3.2. Cinétique de croissance.....	34
1.2.3.3. Suivi de la production des molécule bioactives.....	34
1.2.4. Extraction et caractérisation partielle des métabolites produits .....	35
1.2.4.1. Culture en milieu liquide.....	35
1.2.4.2. Extraction par les solvants organiques .....	35
1.2.4.2.1. Extraction à partir du culot .....	35
1.2.4.2.2. Extraction à partir du surnageant.....	37
1.2.5. Etude de la stabilité des molécules actives .....	38
1.2.5.1. Effet du pH .....	38
1.2.5.2. Effet de la température .....	38

## Sommaire

---

1.2.6. Production enzymatique .....	38
1.2.6.1. Hydrolyse de l'amidon .....	38
1.2.6.2. Hydrolyse de la caséine .....	38
1.2.6.3. Action sur le lait écrémé .....	39
1.2.7. Galerie biochimique .....	39
1.2.7.1. Recherche de la $\beta$ -galactosidase .....	39
1.2.7.2. Recherche de l'oxydase .....	39
1.2.7.3. Recherche de la catalase .....	39
1.2.7.4. Recherche de la Nitrate Réductase (NR) .....	40
1.2.7.5. Etude de la fermentation des sucres( Glucose ,Lactose, Saccharose ) .....	40
1.2.7.6. L'utilisation du citrate comme seule source de carbone .....	41
1.2.7.7. Caractère Mannitol-mobilité .....	41
1.2.7.8. Détermination de la voie d'attaque des glucides .....	42
1.2.7.9. Caractères rouge de Méthyle et VogesProskauer .....	43
1.2.7.9.1. La réaction RM .....	43
1.2.7.9.2. La réaction VP .....	43
1.2.7.10. Recherche de la production d'indole .....	43
1.2.8. Sensibilité des souches d'actinomycètes utilisées vis-à-vis de certains antibiotiques ...	44

### **Chapitre 2 : Résultats et discussion**

2.1. Etudes morphologiques des souches d'actinomycètes .....	45
2.1.1. Aspect macroscopique et microscopique .....	45
2.2. Criblage des souches d'actinomycètes .....	51
2.2.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar ...	51
2.2.2. Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu solide par la technique des cylindres d'agars .....	56
2.3. Cinétique de croissance des souches SP22 et SP23 .....	61
2.4. Suivi de la production des molécules bioactives par les souches d'actinomycètes .....	63
2.5. Extraction des molécules bioactives par les solvants organiques .....	66
2.5.1. Extraction des molécules bioactives à partir du mycélium .....	67

## Sommaire

---

2.5.2. Extraction des molécules bioactives à partir de surnageant de culture .....	70
2.5.3. Comparaison entre l'activité antibactérienne des extraits du culot et du surnageant. ....	75
2.5.4. Sensibilité des germes cibles .....	75
2.5.5. Evaluation de l'activité antifongique des extraits organiques .....	78
2.6. Etude de la stabilité des molécules produites par les actinomycètes.....	82
2.6.1. Effet de la variation du pH .....	83
2.6.2. Effet de la température .....	87
2.7. Production enzymatique .....	93
2.8. Galerie biochimique.....	97
2.9. Tests de sensibilité aux antibiotiques .....	100
Conclusion.....	102
Références bibliographiques .....	104
Annexes	

Il y a quelques décennies, le monde croyait que la science avait triomphé des maladies infectieuses et que tout était sous contrôle. Les vaccins et les antibiotiques ont effectivement permis de vaincre ou contrôler certains fléaux comme la variole ou la tuberculose, on a même cru, un bref instant, que les menaces bactériennes et virales appartenaient au passé.

Depuis l'introduction des antibiotiques dans l'arsenal thérapeutique des maladies infectieuses les microorganismes ont développé des moyens de défenses leur conférant une insensibilité aux antibactériens ces résistances aux antibiotiques au dose thérapeutiques apparaissent plus au moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leurs sont résistante (GENNE et SIEGRIST, 2003).

L'apparition des bactéries résistantes et l'évolution de leur dissémination constituent une des grandes préoccupations de santé publique au niveau mondial. En 1999, l'Union européenne a fondé l'EuropeanAntimicrobialResistance Surveillance Network (EARSS) qui récolte à partir des différents réseaux nationaux de laboratoires les données de résistance de certaines bactéries : *Streptococcus pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcusfaecalis*, *Enterococcusfaecium*, *Escherichia coli*, *Klebsiellapneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* .

Devant ce problème de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients associe à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques, afin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, des différentes stratégies sont adoptées :

- L'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriés,
- La réalisation de nouvelles molécules semi synthétiques à partir de structures connues ou la synthèse de nouveaux dérivés,
- Poursuite d'isolement de microorganismes producteurs de substances bioactives

## Introduction générale

---

De nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques telle que les actinomycètes. En Algérie, les sols de palmeraies, qui constituent un écosystème particulier, renferment un potentiel assez riche en actinomycètes particulièrement les actinomycètes rarement isolés de par le monde tels que les genres *Planomonospora*, *Planobispora*, *Nocardiopsis*, *Actinomadura*, *Saccharothrix*, etc.

(SABAOU *et al.*, 1998) qui se sont révélés être de grands producteurs de nouvelles molécules antimicrobiennes (ZITOUNI *et al.*, 2005, BOUDJELLA *et al.*, 2006).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs essentiels : le criblage des souches d'Actinomycètes productrices de substances à effet antagoniste vis-à-vis des bactéries et champignons pathogènes, l'extraction de ces molécules bioactives par des solvants organiques, et enfin réaliser une étude préliminaire de caractérisations de ses souches d'actinomycètes.

### Chapitre 1 : Les actinomycètes

#### 1-Définition

Les actinomycètes, organismes procaryotes, sont classés parmi les bactéries. Elles sont incluses dans l'Ordre des actinomycètes défini dans la huitième édition du manuel de BERGEY (1974) comme regroupant : «des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés, lesquels peuvent être assez développés pour former un véritable mycélium. Le diamètre de ces filaments varie entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$  mais est généralement inférieur à 1  $\mu\text{m}$  »

Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (MARIA et SEBALD, 1990).

#### 2-Taxonomie

Pour la caractérisation et l'identification des actinomycètes un ensemble de données phénotypiques et génotypiques doivent être rassemblées, pour arriver jusqu'au niveau de l'espèce ou de la souche. Cette caractérisation polyphasique repose sur les techniques classiques qui sont l'étude de la culture, de la morphologie, de la physiologie, de la chimiotaxonomie et les méthodes génotypiques.

En se basant sur le système de classification de Murray (Bergey's Manual of Systematic of Bacteriology, MURRAY *et al.*, 1989), les actinomycètes ont été classés dans le règne des procaryotes, division des bactéries Gram-positives, classe des Thallobacteria (bactéries Gram-positives ramifiées), dans laquelle on trouve l'ordre des Actinomycétales (OUHDOUCH, 2003). Le tableau 1 montre la classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S (GARRITY *et al.*, 2004).

## Synthèse bibliographique

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

<b>Classe Actinobacteria</b>				
S/Cl <i>Acidimicrobidae</i>	S/Cl <i>Rubrobacteridae</i>	S/Cl <i>Coriobacterida</i>	S/Cl <i>Sphaerobacteridae</i>	S/Cl <i>Actinobacteridae</i>
S/Cl <i>Actinobacteridae</i>				
<i>Bifidobacteriales</i>		<b>Ordre</b>	<i>Actinomycetales</i>	
<b>Actinomycetales</b>				
S/O <i>Actinomycineae</i>	S/O <i>Micrococcineae</i>	S/O <i>Corynebacterineae</i>	S/O <i>Micromonosporinaeae</i>	S/O <i>Propionibacterineae</i>
<b>Famille</b>	<b>Familles</b>	<b>Familles</b>	<b>Famille</b>	<b>Familles</b>
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	<i>Micomonospoiaceae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardioideaceae</i>
S/O <i>Psuedonocardineae</i>	S/O <i>Streptomycineae</i>	S/O <i>Streptosporangineae</i>	S/O <i>Frankinea</i>	S/O <i>Glycomycineae</i>
<b>Familles</b>	<b>Famille</b>	<b>Familles</b>	<b>Familles</b>	<b>Famille</b>
<i>Pseudonocardiaaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Themomonosporaceae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosporiaceae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>

S/Cl: sous classe, S/O: sous ordre

### 3-Les principaux caractères des actinomycètes

#### 3-1-Habitat

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (GOODFELLOW *et al.*, 1983). Elles peuvent être dans les sols, dans les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, elles sont particulièrement abondantes dans le sol, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques où elles constituent une part importante de la population microbienne (LOQMAN, 2009).

**Tableau 2:** Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (GOODFELLOW *et al.*, 1983).

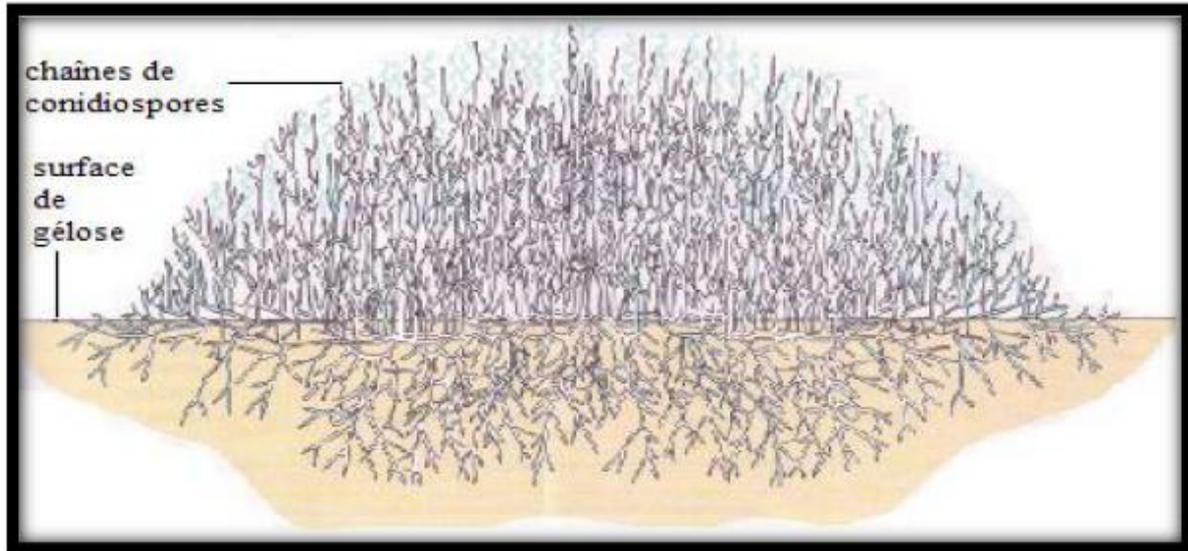
Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplana</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Frankia</i>	Nodules des racines
<i>Microbiospora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, Eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition
<i>Saccharomonospora</i>	Sol, Eau, Litière
<i>Streptomyces</i>	Sol, Eau
<i>Streptosporangium</i>	Matière en décomposition et en fermentation

#### 3-2-Morphologie

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positive (NANJWAD *et al.*, 2010). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle va de formes peu évoluées comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (SMAOUI, 2010).

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forme seulement une masse de filaments ramifiés.

Le second comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (LECHEVALIERetLECHEVALIER, 1985). La figure ci-dessous nous montre une coupe transversale d'une colonie d'actinomycète.



**Figure1** : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (PRESCOTT *et al.*, 2003).

Les colonies formées par les actinomycètes sur des milieux solides présentent différents aspects macroscopiques qui peuvent être regroupés en trois types :

- Des colonies poudreuses couvertes d'hyphes aériens fermement attachés au milieu
- Des colonies pâteuses qui peuvent être facilement détachées des milieux solides
- Des colonies exemptes de mycélium de substrat et se composent d'hyphes aériens attachés au milieu par des crampons.

### 3-3-Physiologie et Métabolisme

Physiologiquement et écologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes. En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. En général, les actinomycètes sont des chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes. Mais plusieurs

espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophique utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (MARIAT et SEBALD, 1990).

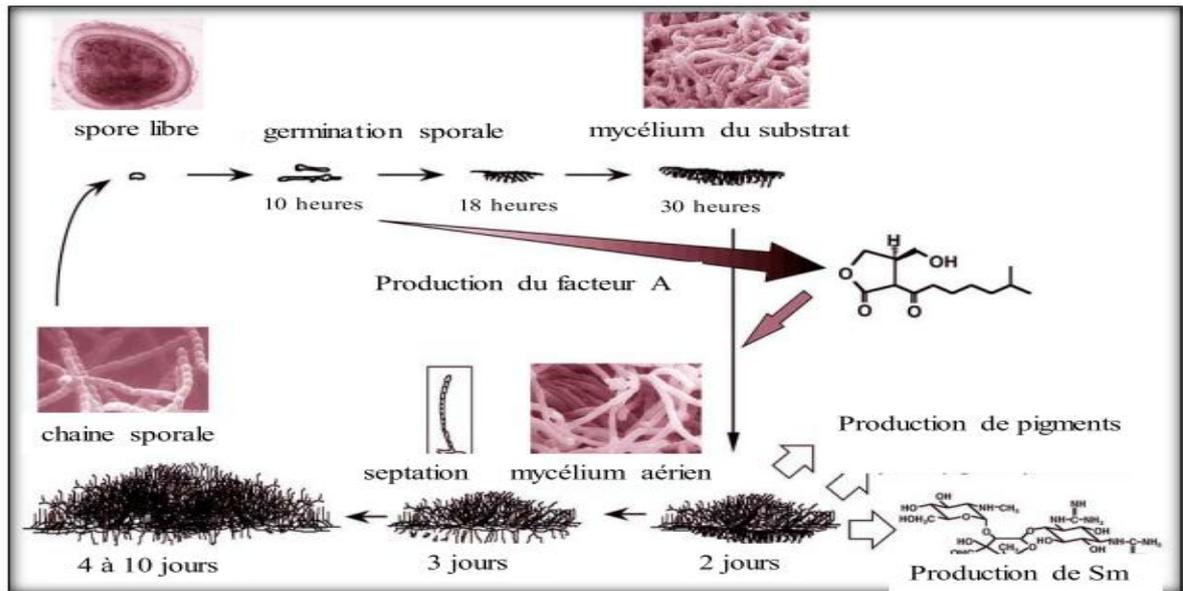
### 3-4-Cycle de développement des actinomycètes

Le cycle de vie de nombreux actinomycètes commence par la germination des spores, processus qui nécessite la présence des ions de calcium. Cette germination donne naissance à un mycélium primaire ramifié (OGARA *et al.*, 2008).

A l'extrémité du mycélium aérien se forme des spores asexuées à paroi fine appelées conidies ou conidiospores, ces spores naissent par séptation du mycélium primaire habituellement en réponse à un stress de l'environnement (manque de nutriment). Si les spores sont localisées dans des sporanges, on les appelle des sporangiospores. Généralement ces spores ne sont pas résistantes à la chaleur, mais résistent bien à la dessiccation et ont de ce fait une importante valeur adaptative, les actinomycètes sont immobiles, excepte pour les spores de certains genres (*Actinoplan*, *Spirillospora*...etc (PRESCOTT *et al.*, 2010).

**Exemple** :Cycle de développement de *Streptomyces griseus*.

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées comme le montre la figure N° 2.



**Figure 2** : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (HORINOUCI, 2002).

### 3-5-Matériel génétique

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3,7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E.coli*(*Escherichia coli*) la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes.

Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujet à des réarrangements. A la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gène codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques (LARPENT *et al.*, 1989).

### 4-Critères d'identification des actinomycètes

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

#### 4-1-Critères morphologiques

La croissance des colonies des actinomycètes est variable en fonction de la Composition des milieux de culture. La forme, la taille et la texture de la colonie sont des critères qui aident à différencier les genres. Les mycéliums, végétatif et aérien, peuvent avoir des pigments intracellulaires différents qui peuvent être observé sur le dos de la colonie (mycélium végétatif) et à la surface de la colonie (mycélium aérien). Ces germes peuvent aussi diffuser des pigments dans le milieu de culture. La couleur des pigments varie selon les espèces (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966).

#### 4-2- Critères physiologique

Les critères physiologiques sont très importants pour l'identification des espèces. Ils consistent en des tests de dégradation de nombreuses substances, des glucides, des lipides, des protéines, un des caractères essentiels pour la différenciation des espèces des *Streptomyces* est la production de pigments mélanoïdes.

Les principaux caractères physiologiques utilisés en taxonomie des actinomycètes sont :

- les optima du pH et de la température de croissance.
- la sensibilité au chlorure de sodium et aux antibiotiques ainsi qu'à certains agents chimiques.
- l'utilisation de sources carbonées et azotées ainsi que la dégradation de certains polymères tels que l'amidon, la caséine et la gélatine.
- la production de mélanine (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966).

### 4-3- Critères biochimiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constitue le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie (AOUAR, 2006).

#### 4-3-1-Composition en acides aminés

Les Streptomyces et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contrairement à l'ensemble des autres Actinomycétales (AOUAR, 2006).

#### 4-3-2-Composition en sucres

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs.

Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les Streptomyces et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les Thermoactinomyces. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des Actinoplanes et du genre *Micromonospora* (AOUAR, 2006).

#### 4-3-3-Composition en lipides

Ce sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre. Les acides gras rencontrés chez les actinomycètes sont, soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbone, soit un groupe d'acides mycoliques de 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus* (COLLIN *et al.*, 1981).

### 4-4-Critères moléculaires

#### 4-4-1-Composition en GC%

En 1949, Chargaff et ses collaborateurs, montrent que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier, mais qu'il était relativement constant pour les individus d'une même espèce. Chez les bactéries, les valeurs du (G+C %) sont très dispersées et elles varient de 25 à 75 %. Actuellement, on admet que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les (G+C %) diffèrent de plus de 10 % ne peuvent appartenir à un même genre. Bien sûr, des valeurs du (G+C %) identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN.

**Tableau 3** : Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (WILLIAMS *et al.*, 1989).

Genre	G+C%
<i>Actinomadura</i>	64 à 69
<i>Nocardia</i>	64 à 72
<i>Streptomyces</i>	69 à 78
<i>Micromonospora</i>	71 à 73
<i>Actinoplanes</i>	72 à 73
<i>Actinopolyspora</i>	64
<i>Agromyces</i>	71 à 77
<i>Frankia</i>	66 à 71
<i>Glycomyces</i>	71 à 73
<i>Nocardiospsis</i>	64 à 69
<i>Rhodococcus</i>	63 à 72
<i>Streptosporangium</i>	69 à 71
<i>Streptoverticillium</i>	69 à 73
<i>Thermoactinomycines</i>	53 à 55

#### 4-4-2-Hybridations ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN repose sur le contrôle de la réassociation de monobrans d'ADN de différents organismes. Le degré de cette réassociation est exprimé en

pourcentage (%) d'homologie, et l'organisme est considéré appartenir à l'espèce lorsque ce pourcentage est  $> 70 \%$  et la divergence est  $> 5 \%$ , à une température  $\leq 5 \text{ }^\circ\text{C}$ , dans les mêmes conditions de dénaturation (ANDERSON et WELLINGTON, 2001).

**Tableau 4 :**Spécificités des techniques moléculaires appliquées à la taxonomie des Streptomyces (Anderson et Wellington, 2001).

Cible	Méthode	Spécificité
ADN chromosomique total	- Hybridation ADN-ADN	Genre, espèce
	- Restriction par des endonucléases (RFLP, LFRFA).	Espèce, sous espèce
Amplification aléatoire de fragments d'ADN	- Isolement et clonage de fragments non hybrides par le croisement.	Espèce, sous espèce
Gènes codants des protéines ou des fragments du gène codant le ARNr ou 23S	- Isolement et séquençage de gènes ou de fragment.	Espèce, sous espèce
	- Analyse comparative des séquences.	Famille, genre, espèce

#### 4-4-3-Digestion de l'ADN par des enzymes de restriction (LFRFA)

L'analyse des fragments de restriction à basse fréquence (LFRFA) est une technique qui utilise la totalité du chromosome bactérien, le principe repose sur la digestion de l'ADN avec des enzymes de restriction. Les fragments qui en résultent sont analysés par électrophorèse sur gel à champ de pulsation (PFGE) qui donne un profil d'empreintes de bandes affirmant l'hybridation qui sont utilisées pour déterminer l'apparenté entre les organismes. Cette méthode est utilisée pour déterminer les souches très étroitement reliées mais elle ne peut pas résoudre le problème des relations interspécifiques (pour la même souche) et elle peut donner des erreurs s'il y a des amplifications et délétions chromosomiques assez importantes (ANDERSON et WELLINGTON, 2001).

### 4-4-4-Amplification aléatoire de l'ADN polymorphique (RAPD-PCR)

La RAPD-PCR est une méthode rapide pour le criblage de souches similaires des actinomycètes mais elle exige une optimisation stricte de l'amorce, la température de l'alignement et le mélange de la réaction (MEHLING *et al.*, 1995). Dans cette technique nous utilisons une amorce courte de séquence définie arbitrairement pour amplifier, par PCR, l'ADN génomique, en utilisant une température basse d'alignement, ainsi le polymorphisme peut être détecté. Le produit de PCR donne une bande caractéristique qui permet de différencier entre les chromosomes des souches sans faire appel à des connaissances préalables sur les séquences chromosomiques. Cette méthode peut être utilisée pour la discrimination entre les souches de la même espèce.

### 4-4-5- Séquençage de l'ADN ribosomique

C'est une technique très fiable pour l'identification des actinomycètes (COOK et MEYERS, 2003).

STACKEBRANDT et ces collaborateurs (1981 et 1983), ont été les premiers à utiliser cette technique pour la taxonomie des actinomycètes.

Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique d'une taille de 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries, dont la séquence est spécifique de chaque espèce et dont les extrémités 5' et 3' (15 premières et 15 dernières bases) sont conservées dans toutes les espèces bactériennes. L'étude de l'ADNr 16S, utilise deux techniques de base : la PCR et le séquençage. Cette analyse de l'ADNr 16S a été utilisée ces dernières années pour les groupes à un niveau supra-génique (Famille, Ordre et même Classe) (RAINEY *et al.*, 1996 ; LABEDA et KROPPESTEDT, 2000).

## 5-Intérêts des actinomycètes

### 5-1-Pharmaceutiques

Malgré les progrès de synthèses chimiques. En effet, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces* (SIBANDA *et al.*, 2010). Les actinomycètes ont un rôle très important dans le secteur

pharmaceutique. De nombreux isolats produisent des substances intéressantes, telles que les antibiotiques les vitamines, des substances antihistaminiques, vasodilatatrices ou immunostimulante et des enzymes utilisées dans les industries.

### 5-2- Agronomiques

La fonction écologique principale des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (PRESCOTT *et al.*, 2010) , grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzyme hydrolytique, comme les protéases, les nucléases, les lipases, etc. (PRAKASH *et al.*, 2012).

Les actinomycètes constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol; on a suggéré plusieurs explications à cette large distribution, telles que leur grande capacité d'utilisation des substrats et leur activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes de même habitat (KUSTER, 1976 ; ISHIZAWA ; ARARAGI, 1976 et ALEXANDER, 1977).

**Tableau 5:** Nombre de souches d'actinomycètes produisant des métabolites bioactifs (BERDY, 2005).

Famille/ Genre	Nombre	Famille/ Genre	Nombre
<b><i>Streptomycetaceae</i></b>		<b><i>Thermomonosporaceae :</i></b>	
<i>Streptomyces</i>	8000	<i>Actinomadura</i>	345
<i>Streptoverticillium</i>	258	<i>Saccharothrix</i>	68
<i>Kitasatosporia</i>	37	<i>Microbispore</i>	54
<i>Chainia</i>	30	<i>Actinosynnema</i>	51
<i>Microellobosporia</i>	11	<i>Nocardiopsis</i>	41
<i>Nocardioides</i>	9	<i>Microtetraspora / Nonomuria</i>	26/21
		<i>Thermomonospora</i>	19
		<i>Micropolyspora / Faenia</i>	13/3
		<i>Thermoactinomyces</i>	14
		<i>Tharmopolyspora</i>	1
		<i>Thremoactinopolyspora</i>	1
<b><i>Micomonosporaceae:</i></b> <b>(<i>Actionoplanetes</i>)</b>	<b>Nombre</b>	<b><i>Mycobaterianaceae:</i></b> <b>(<i>Actinobacteria</i>)</b>	<b>Nombre</b>
<i>Micromonospora</i>	740	<i>Nocardia</i>	(357)
<i>Actinoplanes</i>	248	<i>Mycobacterium</i>	57
<i>Dactylosporangium</i>	58	<i>Arthrobacter</i>	25
<i>Ampullariella</i>	9	<i>Brevibacterium</i>	17
<i>Glycomyces</i>	2	<i>Proactinomyces</i>	14
<i>Catenuloplanes</i>	3	<i>Rhodococcus</i>	13
<i>Catellatospora</i>	1		

## Synthèse bibliographique

<i>Pseudonocardiaceae</i>		<i>Autres espèces(non classées):</i>	
<i>Saccharopolyspora</i>	131	<i>Actinosporangium</i>	30
<i>Amycalotopsis / Nocardia</i>	120/357	<i>Microellobosporia</i>	11
<i>Kibdellosporangium</i>	34	<i>Frankia</i>	7
<i>Pseudonocardia</i>	27	<i>Westerdykella</i>	6
<i>Amycolata</i>	12	<i>Kitasatoa</i>	5
<i>Saccharomonospora</i>	2	<i>Synnenomyces</i>	4
<i>Actinopolyspora</i>	1	<i>Sebekia</i>	3
		<i>Elaktomyces</i>	3
		<i>Excelsospora</i>	3
		<i>Waksmania</i>	3
		<i>Alkalomyces</i>	1
		<i>Catellatospora</i>	1
		<i>Erythrosporangium</i>	1
		<i>Streptoplanospora</i>	1
		<i>Microechinospora</i>	1
		<i>Salinospora</i>	1
<b><i>Streptosporangiaceae:</i></b> <b>(<i>Maduromycetes</i>)</b>	<b>Nombre</b>		
<i>Streptosporangium</i>	79		
<i>Streptoalloteichus</i>	48		
<i>Spirillospora</i>	11		
<i>Planobispora</i>	10		
<i>Kutzneria</i>	4		
<i>Planomospora</i>	2		

### Chapitre 2 : Les antibiotiques et les antifongiques

#### I- Les antibiotiques

##### 1- Définition

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

##### 2-Classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. La classification des antibiotiques en tenant compte du spectre antimicrobien ne paraît pas être la meilleure en raison de l'évolution de la résistance bactérienne. La classification chimique permet de classer les antibiotiques en groupes assez homogènes mais éloignés des objectifs cliniques. Enfin, celle basée sur le mécanisme d'action rend compte des propriétés particulières de chaque groupe d'antibiotiques (WALSH, 2000). La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification. Les antibiotiques peuvent être classés selon leurs modes d'action sur les agents infectieux, en fonction des microorganismes qu'ils inhibent ou bien selon leurs structures chimiques. En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles-mêmes divisées en plusieurs classes à savoir, les aminoglycosides, les  $\beta$ -lactamines, les céphalosporines, les chloramphénicol, les glycopeptides, les lincomycines, les macrolides, les quinolones, les sulfamides, les tétracyclines, les antibiotiques peptidiques, les dérivés de dicétopipérazines, les peptides cycliques, etc. (SMAOUI, 2010).

##### 2-1- Familles des $\beta$ -lactamines

La famille des  $\beta$ -lactamines comprend un grand nombre de molécules, toutes caractérisées par la présence d'un cycle  $\beta$ -lactame indispensable à l'activité antibiotique. Les  $\beta$ -lactamines sont des molécules cycliques qui interfèrent avec les étapes finales de la synthèse du peptidoglycane (CAVALLO *et al.*, 2004). Ils exercent une action bactéricide sur de nombreuses espèces bactériennes. La thienamycine connu sous le nom de imipénème, l'un des derniers antibiotiques découvert possédant un cycle lactame et doté d'un large spectre

d'action, est produit par l'espèce actinomycetale, *Streptomyces cattleya* (DEMAIN et LANCINI, 2006).

### 2-1-1- Les pénicillines

Le terme pénicilline regroupe plus de 50 antibiotiques chimiquement apparentés. Toutes les pénicillines ont une structure commune dans laquelle la chaîne cyclique  $\beta$ -lactame tient lieu de noyau. De ce fait, on les appelle aussi  $\beta$ -lactamines. Elles se distinguent par les chaînes latérales chimiques qui sont rattachés au noyau. Les pénicillines sont produites par voie naturelle ou par voie semi synthétique (TORTORA, 2012). Elles agissent en faisant obstacle à l'assemblage du réseau macromoléculaire du peptidoglycane ; ce qui bloque les dernières étapes de la formation de la paroi cellulaire ; en particulier celle des bactéries à Gram positif. Du même coup, elles inhibent la croissance du microbe. Dépourvu de protection, celui-ci meurt rapidement (TORTORA, 2012).

### 2-2-Famille des céphalosporines

Les céphalosporines appartiennent à la classe des céphèmes. Elles ont été classées en quatre générations selon leur spectre d'activité (JACQUES, 2004). La céphalosporine C est un antibiotique naturel extrait du *cephalosporidium*, un champignon. Elle fut le premier membre de cette famille. Celle-ci s'étoffait peu à peu sous l'impulsion des chercheurs, qui ont synthétisé des molécules de plus en plus efficaces et de moins en moins sensibles aux défenses des bactéries. On parle de céphalosporines de 1ère, 2ème, 3ème et 4ème génération. Ces dernières ont la particularité d'être efficaces sur des zones de l'organisme qui ne pouvaient être traitées jusque-là, comme le liquide céphalo-rachidien. On peut citer les plus avancées : céfépime et ceftiofime (NATHAN et EBERLIN, 1994).

### 2-3-Famille des aminosides

Les aminoglycosides, ou aminosides, forment une famille d'antibiotiques dont les molécules sont reliées par des liaisons glycosidiques. Ils comprennent la streptomycine et la gentamicine, qui perturbent les premières étapes de la synthèse des protéines en modifiant la conformation de la sous-unité 30S du ribosome procaryote. Il en résulte des erreurs de lecture

du code génétique des ARNm (TORTORA, 2012). L'antibiotique le plus connu est la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* et la gentamycine produite par *Micromonospora purpurea* (DEMAIN et LANCINI, 2006).

### 2-4-Famille des phénicol

On retrouve dans ce groupe le chloramphénicol, facile à synthétiser. Ce sont des antibiotiques à large spectre, capables de traiter de nombreuses zones de l'organisme, dont le système nerveux central, mais à toxicité élevée. On les utilise par exemple dans le traitement des méningites (NATHAN et EBERLIN, 1994). Le chloramphénicol est un antibiotique bactériostatique à large spectre qui perturbe la synthèse des protéines. En se liant à la sous unité 50S du ribosome, il inhibe la formation des liaisons peptidiques dans les polypeptides en croissance. Du fait de sa structure chimique relativement simple, il est moins dispendieux à synthétiser chimiquement qu'à isoler à partir de culture de *Streptomyces*. Sa faible taille moléculaire facilite sa diffusion dans des régions du corps habituellement inaccessibles à beaucoup d'autres agents.

### 2-5-Famille des tétracyclines

Les tétracyclines possèdent une structure particulière, elles sont formées de 4 cycles accolés sur lesquels sont fixées diverses chaînes latérales. Ces antibiotiques inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l'aminocyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien (PRESCOTT *et al.*, 2007). Elles s'interposent entre les ARN t porteurs des acides aminés et la sous-unité 30S du ribosome, ce qui empêche l'ajoute de nouveaux acides aminés au polypeptide en formation.

### 2-6-Les macrolides

Les macrolides font partie d'une famille d'antibiotiques qui tire son nom du macrocycle lactone que ces agents renferment (TORTORA, 2012). Les macrolides comportent un grand cycle de 14, 15 ou 16 carbones. Ils ont un spectre étroit. Ces antibiotiques traversent les membranes bactériennes pour parvenir dans le cytoplasme de la

bactérie où ils vont se fixer sur leur cible : l'unité 50S du ribosome. Cette fixation perturbe la synthèse des protéines (JACQUES, 2004). Ce groupe agit par blocage de la synthèse protéique des germes résistant aux  $\beta$ -lactamine et aux tétracyclines (en particulier les staphylocoques). Il se caractérise par une forte élimination biliaire pour la spiramycine et, à moindres degrés, l'érythromycine.

### **2-7-Les quinolones**

Les quinolones sont des composés cycliques et l'ajout de fluor sur la structure de base a permis d'obtenir les fluoroquinolones. Toutes les molécules de cette famille inhibent la réplication de l'ADN bactérienne. Pour ce faire, elles se fixent sur une enzyme indispensable à la réplication : la gyrase ou ADN gyrase, cette enzyme était intra-cytoplasmique. La quinolone doit traverser les différentes membranes bactériennes (JACQUES, 2004).

### **2-8-Les polypeptides**

Ce sont des antibiotiques bactéricides à spectre étroit, on les utilise dans les infections sévères à bacilles gram négatif. Ce sont les antibiotiques de références pour le traitement des endocardites. La famille de polypeptide, qui comprend la colistine, la polymyxine B, la bacitracine et la tyrothricine, présente les caractéristiques communes suivantes :

- Structure polypeptidique
- Activité contre les bacilles gram positifs sauf la bacitracine
- Faible absorption ; d'où leur usage en antibiothérapie digestive.

## **3-Mécanisme d'action de l'antibiotique**

Les antibiotiques sont soit bactéricides, c'est-à-dire capable de tuer les bactéries qui y sont sensibles, soit simplement bactériostatiques, c'est-à-dire aptes à empêcher la multiplication des bactéries sans les tuer. Dans ce cas, les mécanismes de défense de l'hôte (la personne infectée) se chargent de détruire les bactéries restantes, et un antibiotique, bactéricide à une certaine concentration, peut s'avérer bactériostatique à concentration plus faible. Il est caractéristique des antibiotiques d'agir en un site bien précis de la cellule. Selon l'antibiotique, ce site d'action peut être la paroi cellulaire, la membrane

cytoplasmique ou la machinerie de synthèse des protéines, ou encore une enzyme impliquée dans la synthèse des acides nucléiques .

### **3-1-Action sur la synthèse de la paroi bactériennes**

La paroi bactérienne est une structure rigide composée de peptidoglycane. Il s'agit d'un réseau tridimensionnel d'acides aminés et de chaînes polysaccharidiques, constituées de N-acétylglucosamine (NAG) et d'acide N-acétylmuramique (NAM).

### **3-2-Action sur la membrane cellulaire**

La membrane plasmique des microbes, située juste après la paroi cellulaire, est la cible de nombreux agents antimicrobiens. Essentielle à la cellule, cette membrane joue un rôle actif dans la régulation de l'entrée des nutriments et de l'élimination des déchets. Certains antibiotiques, en particulier les antibiotiques polypeptidiques, influent sur la perméabilité de la membrane plasmique des bactéries. Ces modifications engendrent la rupture de la membrane et, par conséquent, la perte d'importants métabolites cellulaires (TORTORA, 2012).

### **3-3- Action sur la synthèse des acides nucléiques**

La synthèse des acides nucléiques (ADN et ARN) peut aussi être perturbée par les antibiotiques (Figure 3) : cas des sulfamides, du triméthoprime, des quinolones, des rifamycines et des nitro-imidazoles (BENZEGGOUTA, 2005).

La structure des acides nucléiques bactériens ou fongiques (ADN ou ARN) ne présente aucune particularité. Par conséquent, les antibiotiques qui agissent à ce niveau sont toxiques pour toutes les cellules. On utilise d'ailleurs cette propriété pour une action antimitotique (dans les antitumoraux). Les antibiotiques de *Streptomyces* employés en tant que cytostatiques sont de différentes natures : la mitomycine et l'adriamycine (anthracyclines), l'actinomycine (peptide), la bléomycine (glycopeptide), la puromycine (nucléoside). D'autres molécules sont utilisées en tant qu'antibactériens comme la novobiocine (glycoside) qui inhibe la réplication de l'ADN et la rifamycine

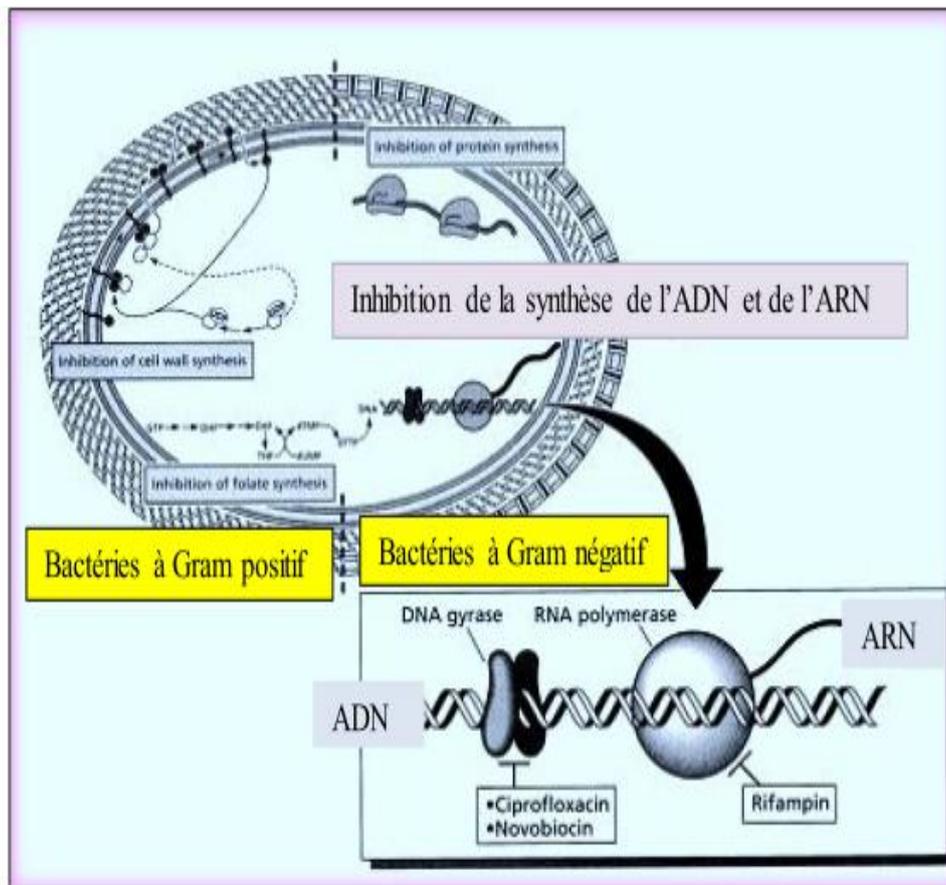
## Synthèse bibliographique

(ansamycine) qui bloque la synthèse de l'ARNm par inhibition de l'ARN polymérase bactérienne (KIESER *et al.*, 2000 ; TORTORA *et al.*, 2003).

Dans cette classe, on trouve deux groupes d'antibiotiques. Un premier agit directement sur la synthèse des acides nucléiques, et un deuxième groupe intervient au niveau de leurs précurseurs de synthèse. Dans le premier groupe on peut distinguer :

-Les quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN telles que les topo-isomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN.

-Le deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique jouent un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines (SMAOUI, 2010).



**Figure 3:** Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (WALSHE *et al.*, 2001).

### 4-Résistances aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Les antibiotiques sont au départ des substances naturelles générées par des champignons mais aussi par certaines bactéries pour se défendre contre les autres bactéries. Les bactéries deviennent résistantes à un antibiotique du jour à lendemain, lorsqu'elles subissent une mutation qui modifie la cible visée par l'antibiotique ou encore lorsqu'elles acquièrent d'une autre bactérie l'information génétique permettant de détruire ou d'inactiver l'antibiotique.. Dès 1940, juste après la découverte de la pénicilline, ABRAHAM et CHAIN avaient mis en évidence l'existence de résistance à cet antibiotique chez *E coli* .Les bactéries s'adaptent aux antibiotiques et deviennent résistantes.

#### 4-1- Les types de résistance

##### 4-1-1- Résistance naturelle

Si les antibiotiques, molécules naturelles, sont synthétisés par la plupart des micro-organismes pour supplanter d'autres micro-organismes dans un environnement donné, ces substances peuvent ne pas être actives sur tous les micro-organismes. On dira que ces micro-organismes ont une résistance naturelle vis-à-vis de cette molécule. La résistance naturelle à un antibiotique donné est un caractère présent chez toutes les souches de la même espèce (COURVALIN *et al.*, 2001). C'est ainsi que, les bacilles à Gram négatif sont naturellement résistants aux antibiotiques hydrophobes car ces molécules ont des difficultés à passer la membrane externe de leur paroi. Les mycoplasmes, bactéries dépourvues de parois présentent une résistance naturelle aux  $\beta$ -lactames, puisque le mode d'action de cette famille d'antibiotique consiste à inhiber la synthèse du peptidoglycane (NORMAK et NORMAK, 2002).

##### 4-1-2-Résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou

à un groupe d'antibiotiques, ces nouveaux gènes peuvent être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (WRIGHT, 2007).

## II-Les antifongiques

### 1-Définition

Les substances antifongiques sont actuellement utilisées dans trois domaines principaux: en thérapeutique humaine et vétérinaire (antifongiques systémiques ou topiques) dans l'industrie alimentaire (conservateurs) et en alimentation animale, pour la prévention et le traitement des atteintes fongiques des plantes, du bois de construction ou d'autres matériaux. Ces substances antifongiques ont deux origines: ce sont soit des produits du métabolisme secondaire de divers microorganismes, soit des produits chimiques de synthèse.

Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine (BASTIDE *et al.*, 1986).

### 2-Classification

Malgré la recherche permanente de nouvelles cibles cellulaires, l'arsenal thérapeutique disponible pour lutter contre les infections fongiques est relativement limité puisque seules quatre classes de molécules, ciblant trois voies métaboliques distinctes, sont utilisées aujourd'hui en clinique : les fluoropyrimidines, les polyènes, les dérivés azolés et les échinocandines (Vandeputte, 2008). Cependant les antifongiques les plus utilisés dans le traitement des mycoses sont les molécules macrolides polyéniques. Le tableau 6 nous montre les différentes classes d'antifongiques.

**Tableau6:** Les différentes classes d'antifongiques(TULKENS, 2008).

Classe d'antifongiques	Cible	Mécanisme d'action
Polyènes : -Nystatine Fongicide	Membrane fongique	Augmentation de la perméabilité membranaire par formation des complexes avec l'ergostérol
Azols : -voriconazole Fongistatique	Membrane fongique	Inhibition de la synthèse de l'ergostérol
Fluoro-pyrimidine -Flucytosine Fongistatique	Acide nucléique	Perturbation de la synthèse protéique
Candines -Caspofungine Fongicide pour <i>candida</i> Fongistatique pour <i>Aspergillus</i>	Paroi fongique	Inhibition de la B(1-3)D Glucane synthétase

### **Chapitre3 : Les différents types de substances bioactives produites par les actinomycètes**

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (LOUCIF,2011).

#### **1- Les antibiotiques**

Les antibiotiques constituent la part la plus importante des applications industrielles des actinomycètes et principalement des *Streptomyces*. Ces molécules d'origine naturelle manifestent à faibles concentrations des activités biologiques de nature principalement antibactérienne, antifongique, anticancéreuse, antivirale ou antiparasitaire. Si les antibiotiques sont connus d'abord pour leurs applications médicales, ils présentent aussi un intérêt significatif dans les domaines de la santé animale, de l'élevage et de l'agriculture (BERDY, 1987). D'autre part, il est nécessaire de souligner l'ampleur des travaux d'hémisynthèse réalisés à partir de certains antibiotiques naturels. Le tableau 7 présente quelques antibiotiques produits par les actinomycètes.

**Tableau 7** : Exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
<b>1 : Les agents antibactériens</b>		
<i>Micromonospora sp</i>	Clostomycine	TAKAHASHI <i>et al.</i> ( 2003)
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicine	JIN NEZ <i>et al.</i> (2009)
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigne	LIU <i>et al.</i> ( 2007)
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	INOUE <i>et al.</i> (2007)
<i>Marinispora sp</i>	Marinomycines	STURDIKOVA et STURDIK. (2009)
<i>Verrucosipora sp</i>	Abyssomycine	STURDIKOVA et STURDIK. (2009)
<b>2 : Les agents antifongiques</b>		
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine	FUKUNAGA <i>et al.</i> ( 2008)
<i>Streptomyces humidus</i>	Phénylacétate	HWANG <i>et al.</i> ( 2001)
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalécine	MUKAI <i>et al.</i> (2006)
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B	CARLE <i>et al.</i> (2003)
<b>3 : Les bioherbicides et les bioinsecticides produits par les actinomycètes</b>		
<i>Saccharopolyspora sp</i>	Spinosad. insecticide neurotoxique	WILLIAMSON <i>et al.</i> (2006)
<i>Actinomadura sp</i>	Herbicides <b>Exemple 1.</b> 2.4-Dihydro-4-( $\beta$ -D-ribofuranosyl)-1.2.4 (3H)-triazol-3-one	SCHMITZER <i>et al.</i> (2000)
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<b>Exemple 2.</b> Herbimycine	OMURA <i>et al.</i> (2006)

### 1-2-Le mécanisme de production des antibiotiques par les actinomycètes

La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les actinomycètes, 50 à 75% des souches isolées en sont productrices et sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde (OKAMI, 1988).

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Intermédiaire à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la

synthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. Le niveau de production des métabolites secondaires, notamment chez les actinomycètes, dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponibles et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. Ces deux leviers de régulation du métabolisme secondaire sont influencés par de nombreux paramètres, entre autres nutritionnelles et physico-chimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers (STRUB, 2008).

### 2-Les enzymes

Les actinomycètes synthétisent des chitinases, des glucanases, des peroxydases (TOKALA *et al.*, 2002) et des glutaminases (DIVYA TEJA *et al.*, 2014). Des espèces de *Streptomyces* produisent des amylases, des cellulases et des hémi-cellulases. D'autres sont capables de dégrader la lignine. *Streptosporangium sp.* isolé à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon (HASEGAWA *et al.*, 2006). Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycétales, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, en monoglycérides, en glycérol et en acides gras (SOMMER *et al.*, 1997). La production d'enzymes chinolytiques (chitinases et cellulases) par *Streptomyces albovinaceus*, *S. caviscabies*, *S. griseus*, *S. setonii* et *S. virginiae* est considérée comme l'action antagoniste la plus efficace dans le contrôle de certaines maladies fongiques en raison de leur action directe sur les chitinases (MACAGNAN *et al.*, 2008). Les protéases sont parmi les enzymes les plus importantes, elles constituent plus de 65% des applications industrielles totales comme agents blanchisseurs dans les détergents ou dans la synthèse des peptides. *Nocardioopsis sp.* NCIM 5142 et *Streptomyces pactum* DSM 40530 sont parmi les actinomycètes les plus exploitées dans la production des peptides (THUMAR et SINGH, 2007).

### 3-Les bioinsecticides et les biopesticides

Les actinomycètes sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (Voir tableau 7).

### I-Matériel et méthodes

L'objectif principal de la présente étude, consiste en la production et l'extraction des principes actifs à partir des actinomycètes en culture solide et liquide et d'examiner les activités de ces molécules en travail expérimental au niveau des laboratoires communs I et II d'analyses physico-chimiques et le laboratoire pédagogique de microbiologie de l'université MOULOUD MAMMERI de Tizi Ouzou.

#### 1-Matériel

##### 1-1-Appareillage

- Rotavapor
- Autoclave : WEBECO. Allemagne.
- Etuve (28-37°C) : BINDER. Allemagne.
- Le Bain Marie : MEMMERT. Allemagne.
- Centrifugeuse : HettichUniversal / K2S.
- Agitateur : GERHARDT. Allemagne
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne.
- Réfrigérateur : ENIEM. Algérie.

##### 1-2-Matériel de laboratoire

**Tableau 8** : Produits chimiques et milieux de culture utilisés

		Source	Utilisation
Solvants	Acétate d'éthyle	Biochem Chemopharma France	Extraction des molécules bioactives
	n-Hexane		à partir du surnageant
	Méthanol	Sigma Aldrich Allemagne	Extraction des molécules bioactives à partir du mycélium

## Matériel et méthodes

<b>Réactifs</b>	Nitrate réductase ( NRI et NRII) Voges Proskauer (VP) Poudre de Zinc Disque d'ONPG Disque d'oxydase		Galerie biochimique
	Violet de gentiane Lugol Fuchsine		Coloration de Gram
<b>Acides et bases</b>	NaOH  HCl		Ajustement de pH
<b>Milieux de culture</b>	Milieu Mueller-Hinton (MH)	Conda Pronadisa Espagne	culture des souches bactériennes et antibiogramme
	Milieu Sabouraud	Institut Pasteur Algérie	Culture des souches fongiques
	Milieu Bennet	Préparer ou laboratoire	Culture des souches d'actinomycètes

Voir annexe 1 pour la préparation des milieux de culture utilisés.

### 1-3-Souches microbiennes utilisées

**Tableau 9:** Les différentes souches microbiennes utilisées (les souches bactériennes et les souches fongiques ).

			<b>Provenance</b>
<b>Souches bactériennes</b>	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie UMMTO
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Gram positif	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi Ouzou
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif	
	Cinq souches d'actinomycètes (SP20,SP22,SP23,SP24 et SP25)	Gram négatif	Isoler dans des travaux de BEN YAOU. (2015)
<b>Souches fongiques</b>	<i>Candida albicans</i>	Levure	Laboratoire de microbiologie UMMTO
	<i>Aspergillus niger</i>	Moisissure	

### 2-Méthode

#### 1-Présentation des cinq souches d'actinomycètes

Les cinq souches d'actinomycète (Sp20, Sp22, Sp23, Sp24, Sp27) ont été isolées et purifiées à partir des échantillons prélevés au niveau de la source « Amezyav Ath Yaou » commune d'Ain El Hammam, wilaya de Tizi-Ouzou (BEN YAOU, 2015).

##### 1-1-Etudes morphologiques des souches

Les critères morphologiques sont déterminés par l'observation directe de l'aspect des colonies sous microscope optique (G x100). Il s'agit de : la forme des colonies (circulaire, irrégulière), leur taille, surface (duveteuse, lisse, rugueuse), couleur, consistance (sèche, crémeuse), présence ou absence de filaments, d'infusibilité du pigment.

##### 1-2-Préparation des frottis

Sur une lame en verre stérile on dépose une goutte d'eau physiologique et à l'aide d'une pipette pasteur on prélève une colonie provenant de la souche à étudier est ensuite étalée à la surface de la lame, séchée et fixée à la flamme du bec bunsen.

##### 1-3-Coloration de Gram

Nous avons procédé à la coloration de Gram, une méthode usuelle employée en bactériologie, qui permet de distinguer les bactéries en Gram positives et en Gram négatives.

- Dilacérer la colonie bactérienne suspecte dans une goutte d'eau physiologique sur la lame porte-objet ;
- Préparer le frottis à la flamme du bec Bunsen ; - Emerger avec du violet de Gentiane pendant 60 secondes.

- Ajouter le Lugol et laisser agir encore 30 secondes ; -Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente ;
- Laver rapidement à l'eau et recouvrir la lame de fuschine pendant 10 secondes ;
- Rincer à l'eau et sécher les préparations à l'aide du papier buvard ;
- Au moment de l'observation, ajouter une goutte d'huile de cèdre (observation à immersion).
- Après l'observation à l'objectif (G×100) la confirmation se fait en se basant sur les caractères microscopiques des Actinomycètes : des filaments fins ou très fins, long parfois court, enchevêtrés ou enroulés, parfois fragmentés présence de spore de très petite taille (voir partie bibliographique chapitre 1).

### **2-Criblage de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar**

#### **2-1-Standardisation de l'inoculum**

C'est une technique qui permet d'avoir des concentrations d'inoculum uniforme par turbidimétrie. Pour chaque souche d'actinomycète un inoculum est réalisé à partir d'une suspension de (0,08-0,1 à 620nm) d'une culture d'actinomycète de 7 jours sur milieu Bennett. On décide d'inoculer deux volumes différents 200-500ul par étalement sur surface. (La suspension de bactérie proposée est d'environ  $10^7$ - $10^8$ cfu/ml).

#### **2-2-Technique des cylindres d'agar**

Cette technique sert à mettre en évidence l'activité antimicrobienne par la présence ou non d'une zone d'inhibition, et à quantifier cette activité par la mesure de diamètre de cette zone (en mm). Elle consiste à ensemencer des souches bactériennes après standardisation des suspensions sur le milieu Mueller- Hinton (MH) par étalement. Des cylindres de 8mm environ de diamètre sont coupés en utilisant une pointe de pipette puis placés sur des boîtes préalablement ensemencées par des bactéries tests. Les boîtes sont laissées à 4°C pendant 4 heures, pour permettre aux métabolites de diffuser sur le milieu puis incubées à 37°C pendant 24h (GUNGI *et al.*, 1983). Pour chaque bactérie test deux témoins positifs (bactérie + Oxytetracycline + Ampicilline) et négatifs (bactérie) ont été réalisés.

### **2-3-Criblage de l'activité antifongique**

Les cinq souches d'actinomyètes possédant une activité antimicrobienne sont ensuite testées contre *Candida albicans* et *Aspergillus niger* par la même technique que la précédente. Les souches sont ensemencées en stries serrées sur le milieu Bennett et incubés à 28°C pendant 10 jours. Des cylindres de 8mm de diamètres sont coupés et placés sur le milieu sabouraud préalablement ensemencé de la souche fongique test. Les boites sont laissées 4h à 4°C ensuite incubées à 28°C pendant 7 jours, les diamètres sont ensuite mesurés. L'amphetrécineB est utilisé comme témoin positif.

### **3-Cinétique de croissance et suivi de la production de métabolites bioactives**

#### **3-1-Culture des souches dans le milieu liquide**

Les deux souches sélectionnées SP22 et SP23 sont incubé dans 80ml de milieu Bennet liquide (milieu Bennet sans agar) à 28°C pour pré culture de 48 heures.

Cette pré culture de 48h sert a ensemencé 400ml de milieu Bennet liquide et incubé à 28°C pendant 12jours sous agitation.

#### **3-2-Cinétique de croissance**

La cinétique de croissance à été suivie en culture batch réalisé en Erlen de 600ml contenant 400ml de milieu Bennet liquide. Des prélèvements de 20ml sont effectuées après chaque 48heures pendant 12 jours pour la détermination de la densité optique à 620nm et la mesure du pH.

#### **3-3-Suivi de la production des molécules bioactives**

Des prélèvements de 20 ml sont centrifugés à 5000 g pendant 15 minutes le surnageant est testé sur des bactéries par des disques de papier wattman. Des disques du papier wattman N°1 d'environ 6mm sont imprégné avec 15 µL dusurnageant sont déposé sur des boites de pétri préalablement ensemencer avec 150µLde suspensions bactériennes cibles (culture de

24h) sur le milieu MH. Les boîtes sont laissées 4h à 4°C puis incubées à 37°C. Les diamètres d'inhibitions sont mesurés après 24h d'incubation (OUELHADJ *et al.*, 2014).

### **4-Extraction et caractérisation partielle des métabolites produits**

#### **4-1-Culture en milieu liquide**

Les souches sélectionnées pour leur effet antagoniste importants SP22 et SP23 sont cultivées dans des Erlen. La production de métabolites actifs a été réalisée sur un milieu liquide (Bennett sans agar). Une Erlen de 600ml contenant 400ml de milieu de culture a étéensemencée avec une pré culture de 80 ml (de 48h), puis incubé pendant 12 jours.

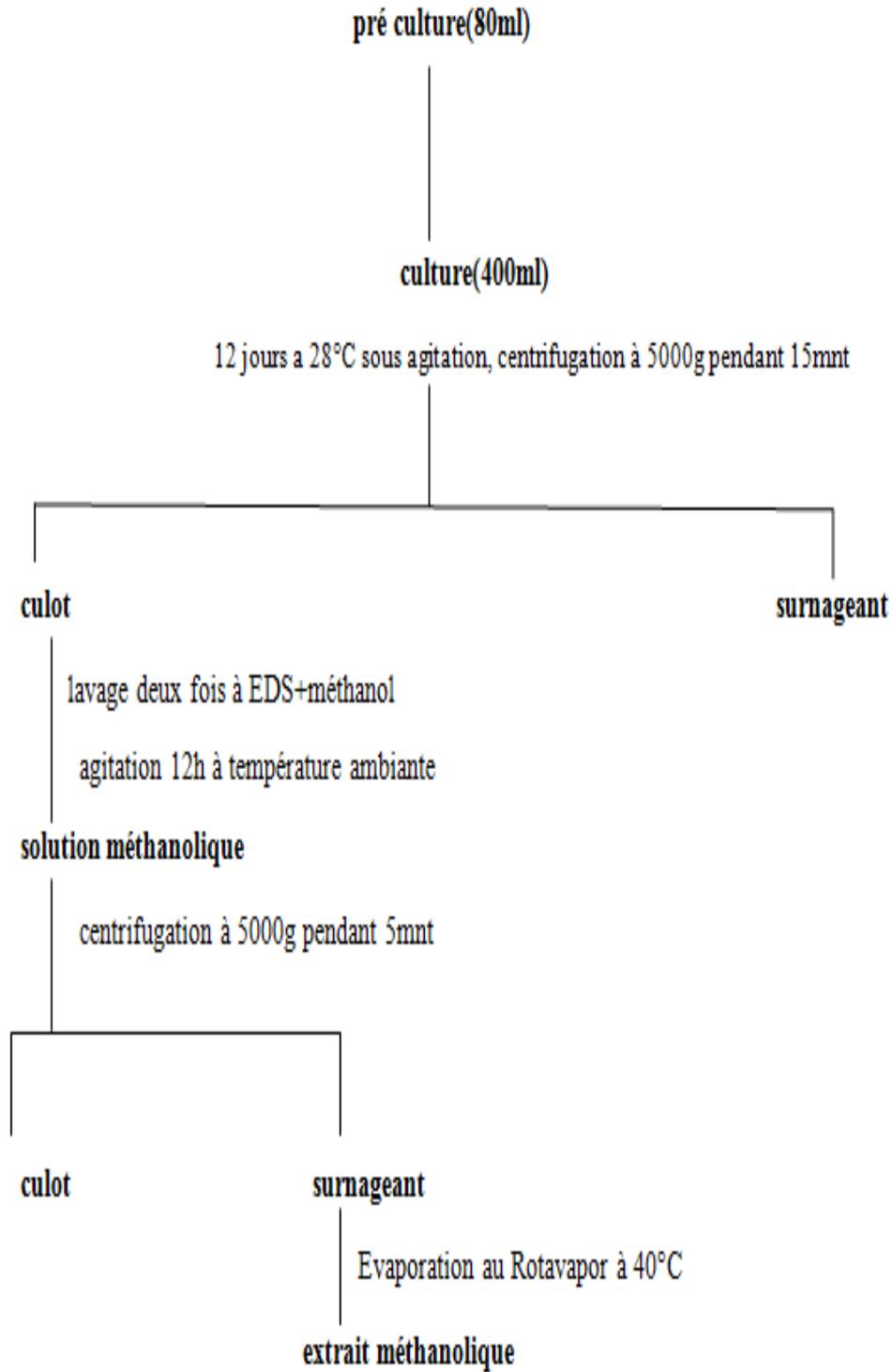
#### **4-2-Extraction par les solvants organiques**

A l'issue de la fermentation, les molécules bioactives sont présentes dans un mélange polyphasique complexe comprenant les cellules, les éléments du milieu et de nombreux autres métabolites.

Les étapes d'extraction et de purification représentent une part importante devant la diversité des organismes producteurs, des milieux de production et des propriétés physicochimiques des antibiotiques, il est impossible de définir un protocole standard d'extraction et de purification après chaque étape, il convient de quantifier l'antibiotique et de déterminer son activité pour apprécier le rendement de l'étape et de la dégradation du produit.

##### **4-2-1-Extraction à partir du culot**

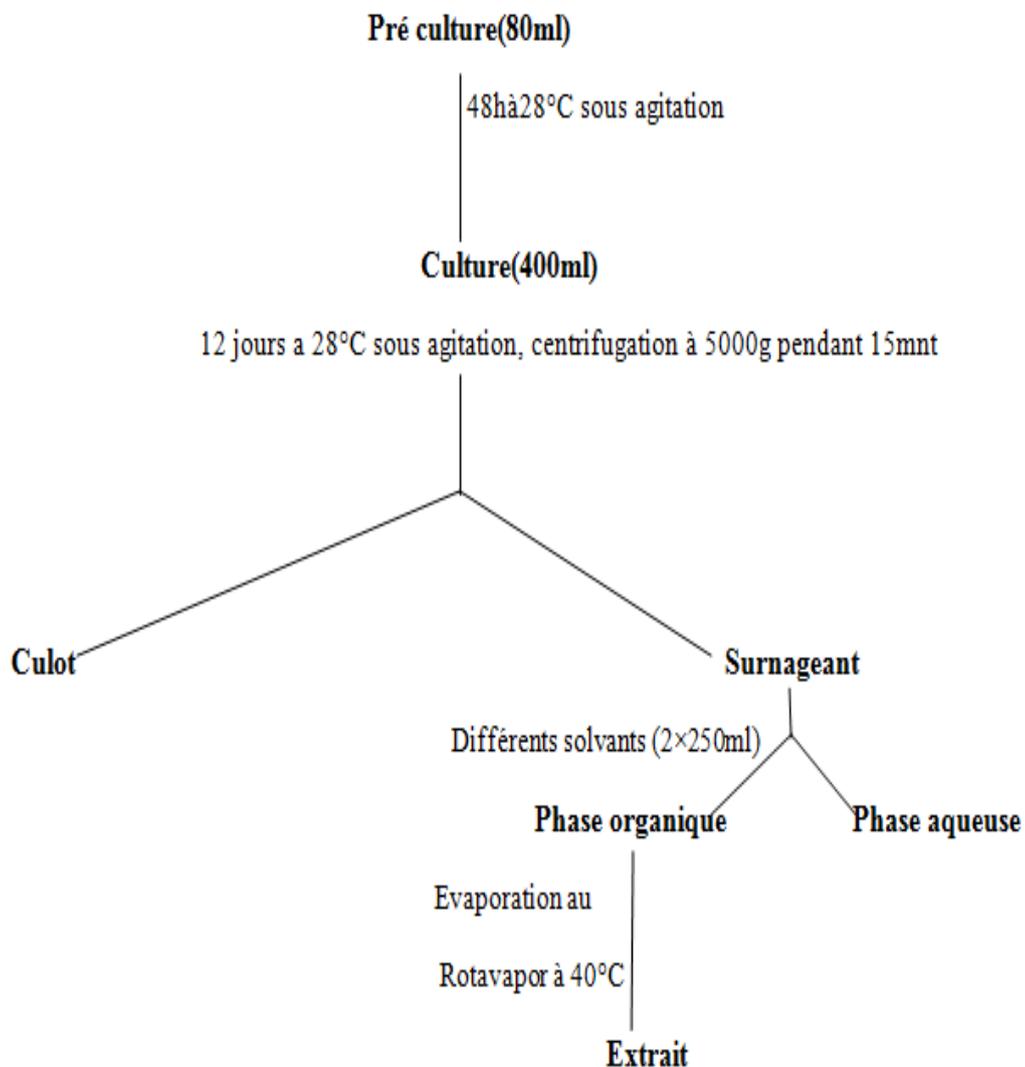
Les cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 15 minutes, le mycélium présent dans le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile. Un volume du culot est traité pendant 12 heures environ, sous agitation à température ambiante, avec cinq volumes de méthanol. La solution obtenue est centrifugée à 5000 g pendant 5 minutes. Ces extraits méthanoliques sont concentrés sous vide à 40°C à l'aide d'un Rotavapor (BOUDMEGHA, 2007).



**Figure 4** : protocole d'extraction à partir du culot(BOUDMEGHA,2007).

### 4-2-2-Extraction à partir du surnageant

Deux solvants non miscibles à l'eau sont testés, afin de déterminer le ou les solvants capables de dissoudre les produits actifs présents dans le surnageant de chaque culture en Erlenmeyer. Les solvants testés sont les suivants : l'acétate d'éthyle, l'hexane, Après séparation des Phases dans les ampoules à décanter, la phase organique obtenues pour chaque souche ont été concentrées par évaporation au Rotavapor à 40°C .Ces extraits sont testés pour leur activité antibactérienne et antifongique par la technique des disques en papierWathman (BOUDMEGHA,2007).



**Figure 5** : Protocole d'extraction des produits actifs à partir du surnageant de culture (BOUDMEGHA,2007).

### 5- Etude de la stabilité des molécules bioactives

Après extraction des fractions actives, il est indispensable d'étudier la stabilité de ces dernières en fonction de certains critères physicochimiques (pH et températures). L'extrait qui a montré une bonne activité antibactérienne est sélectionné pour l'étude de la stabilité par la méthode des disques en papier Wathman contre les germe cibles.

#### 5-1-Effet du pH

Des fractions de l'extrait concentré sont ajustées à des pH différents (3, 7 et 11) puis testées sur des bactéries par la technique des disques en papier Wathman (BADJ *et al.*, 2006).

EB : extrait brut

#### 5-2-Effet de la température

Trois fractions de l'extrait ont subi de différents traitements thermiques : 4 °C pendant une semaine, 110 °C pendant une heure et une autre fraction lissé température ambiante. Leurs activités sont testées (BADJ *et al.*, 2006).

T<sub>m</sub> : température ambiante (T<sub>m</sub>=25°C) .

### 6- Production enzymatique

#### 6-1- Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble (annexe 1) selon la méthode détecté par GORDON et SMITH (1953). Après 14 jours d'incubation à 28°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. A l'inverse, l'apparition d'une couleur beige indique la présence de l'amidon.

#### 6-2-Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de WILLIAMS et CROSS (1971), et de GORDON et SMITH (1953) sur un milieu gélosé contenant 10% de lait écrémé (annexe 1). L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 28°C témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

### **6-3-Action sur le lait écrémé**

Des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10% dans l'eau distillée sont ensemencés avec les souches d'actinomycètes et incubés à 28°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les souches (WILLIAMS et CROSS, 1971).

### **7-Galerie biochimique**

#### **7-1- Recherche de la $\beta$ -galactosidase**

La recherche de la  $\beta$ -galactosidase dans l'identification d'une bactérie est réalisée avec le test ONPG. Quelques millilitres de la souche préalablement mise en suspension sont versés dans un tube à essai au quel on ajoute un disque ONPG. L'apparition d'une couleur jaune au bout d'une heure indique la présence de la  $\beta$ -galactosidase.

#### **7-2-Recherche de l'oxydase**

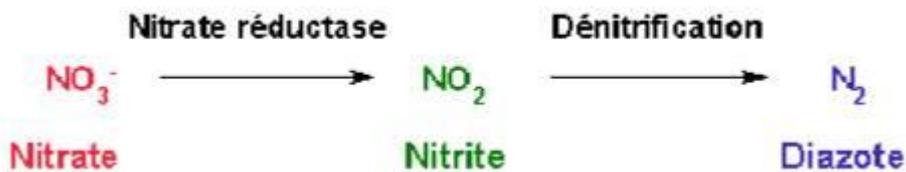
Quelques millilitres de la suspension sont versés dans un tube à essai au quel on ajoute un disque d'oxydase. La réaction est quasi instantanée, si la souche est oxydase positive on devrait constater l'apparition de la couleur violette au bout d'une minute.

#### **7-3-Recherche de la catalase**

La présence de catalase est expérimentalement démontrée en mélangeant quelques colonies de la souche à étudier avec quelques gouttes d'eau oxygénée, s'il y a présence de catalase on constate un phénomène d'effervescence au niveau de l'échantillon.

### 7-4-Recherche de la Nitrate Réductase (NR)

La réduction des Nitrate par la Nitrate Réductase se traduit par la production des Nitrites parfois certaine bactérie peuvent poursuivre cette réduction jusqu'à une dénitrification.



Ce teste va consister à mettre en évidence la présence ou non des Nitrites dans le milieu de culture si ils sont présents ils donnent une réaction coloré rose en présence d'acide sulfanilique(NRI) et de naphtylamine (NRII).ces réactifs portent le nom de réactif de GRIESS.En absence de Nitrite on va rechercher la disparition des Nitrates par addition de Zinc, en effet le Zinc réduit les Nitrate en Nitrite



A la raison de 10 ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium sont ensemencés et incubés à 28° C. Au 5ème, 10ème et 14ème jours d'incubation, 3 gouttes de chacun des réactifs de GRIESS I et II sont ajoutées à 1 ml de culture(Gordon et Smith, 1953).

#### Lecture

A-Milieu rouge orangé : réaction positive la bactérie possède l'enzyme Nitrate réductase au stade Nitrite (NR+)

B- Milieu jaune : on ajoute la poudre de zinc

B1-milieu rouge: présence des Nitrates dans le milieu la bactérie ne possède pas l'enzyme (NR)

B2- coloration jaune : pas de Nitrates dans le milieu la bactérie possède l'enzyme (NR+)

### 7-5-Etude de la fermentation des sucres( Glucose ,Lactose, Saccharose )

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des bactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose et le saccharose. Ce milieu est constitué d'un culot et d'une pente. Des tubes contenant le milieu TSI sont ensemencés en piqure centrale et sur la surface inclinée, puis incubés pendant 7 jours à 28°C. Les résultats se manifestent comme suit :

- Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH)
- Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la concentration de ce sucre a été abaissée au 1/10<sup>ème</sup> de celle du lactose ou du saccharose, de telle façon que la faible quantité d'acide produite sur la pente pendant la fermentation s'oxyde rapidement, ce qui entraîne un retour rapide à la coloration rouge ou bien à une alcalinisation plus prononcée, par contre, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot de tube
- Les germes qui fermentent le lactose et/ou le saccharose font virer au jaune la pente du tube.
- La production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique.
- La production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

### **7-6-L'utilisation du citrate comme seule source de carbone**

Le caractère citrate est recherché sur le milieu Citrate de Simmons. Ce milieu en tube incliné permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie. La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale. Les bactéries capables d'utiliser le citrate de sodium (acide citrique) comme seule source de carbone pourront se développer sur ce milieu. La fermentation du citrate de sodium entraînant une alcalinisation du milieu provoquant un virage de couleur du milieu du vert vers le bleu (le bleu de bromothymol est utilisé comme indicateur de pH).

### **7-7-Caractère Mannitol – mobilité**

Le milieu Mannitol Mobilité est un milieu faiblement gélosé permettant de tester simultanément la mobilité et l'utilisation de mannitol.

- La fermentation du mannitol conduit à la formation de fructose qui est lui-même dégradé en acides courtes chaînes induisant une alcalinisation de milieu dont la couleur vire vers le jaune (changement de couleur de l'indicateur de pH : rouge de phénol).
- La mobilité est mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène (capacité des bactéries à envahir l'ensemble de ce milieu faiblement gélosé).

Un tube de milieu Mannitol Mobilité est ensemencé avec le germe à étudier par piquer centrale puis incubé à 28°C pendant 7 jours.

### 7-8-Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le milieu pour l'étude de la voie d'attaque des Glucides (MEVAG) : il s'agit d'une gélose semi solide généralement composé de gélose et de rouge de phénol en guise d'indicateur du pH. Il permet de caractériser les bactéries fermentaires de celles oxydatives ou indifférentes. Les bactéries peuvent en effet utiliser deux voies pour cataboliser un sucre :

- Lors de la respiration, le glucide est oxydé en CO<sub>2</sub>, par le dioxygène
- Lors des fermentations, le glucide est oxydé en acides, alcools, qui sont libérés dans le milieu qu'ils acidifient sensiblement.
- Pour l'étude d'une souche bactérienne, on utilisera 2 tubes :
- L'un sera recouvert de vaseline (tube fermé)
- L'autre non recouvert (tube ouvert)

Le culot est ensemencé en piqure centrale, celui-ci est ensuite incubé à 28°C pendant 7 jours. Après incubation :

- virage au jaune dans les deux tubes ----- Métabolisme fermentaire      virage au jaune de tube non recouvert de vaseline ----- Métabolisme oxydatif
- pas de virage de couleur dans les deux tubes ----- bactérie inactive vis à vis du sucre

### 7-9-Caractères rouge de Méthyle et Voges Proskauer

Les caractères RM et VP sont étudiés dans le milieu Clarks et Lub ce dernier permet l'identification de la voie de la fermentation des microorganismes. Il existe plusieurs voies de fermentation dont la voie des acides mixtes et la voie du butylène glycol.

#### 7-9-1-La réaction RM

Elle consiste à mettre en évidence par une réaction colorée les bactéries produisant des acides organiques (acide formique, acétique, lactique, butyrique...etc) par voie d'acide mixte.

Dans le cas d'une réaction positive le milieu vire au rouge par acidification, soit la fermentation des acides mixtes. A l'inverse la coloration jaune montre un milieu peu acide ou ré alcalinisé, soit une absence de fermentation des acides mixtes.

#### 7-9-2-La réaction VP

Consiste à mettre en évidence par une réaction colorée les bactéries produisant le butanediol et l'acétone par voie du butylène glycol. La production de l'acétone est mise en évidence par l'ajout de Soude IN(VPI)  $\alpha$ -naphthol(VPII) ce qui provoque un virage du milieu vers le rose.

La souche probablement mise en suspension est ensemencée sur le milieu Clarks et Lub, puis incubée à 28°C pendant 7 jours. Le milieu est ensuite réparti en deux tubes, l'un pour VP et l'autre pour RM.

- Réaction RM : l'ajout de 2 gouttes de solution de Rouge de Méthyle à 2,5% d'alcool à l'un des deux tubes, la réaction est quasi instantanée.
- Réaction VP : l'ajout de 3 gouttes de VPI et 3 gouttes de VPII, laisser le tube ouvert et se maintenir en position inclinée afin de maximiser la surface de liquide en contact avec l'oxygène, laisser agir pendant 10 minutes.

### 7-10-Recherche de la production d'indole

Le milieu Urée-indole estensemencé avec la souche. La lecture est effectuée après 24 heures d'incubation à 28° C. 2 à 3 gouttes du réactif de Kovacs sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

### **8-Sensibilité des souches d'actinomyces utilisées vis-à-vis de certains antibiotiques**

Des disques de quatres antibiotiques différents (Kanamycine, Amoxyline, Cefoxitine et Pénicilline) on été déposés sur des boites de pétries contenant le milieu Bennet préalablement ensemencé avec les souches d'actinomyces cibles puis incubés a 28°C pendant 7 jours.

### I- Études morphologiques des souches d'actinomycètes

#### 1-Aspect macroscopique et microscopique

L'aspect morphologique des souches ont été déterminés sur le milieu Bennet après incubation pendant 7 jours à 28°C. Parmi les caractères principaux des souches étudiés la forme des colonies, la couleur, la présence ou l'absence de filaments ainsi que la production des pigments diffusables les résultats ont été notés dans le tableau ci-dessous.

La croissance des actinomycètes est relativement lente par rapport aux autres bactéries. Le temps d'apparition des colonies d'actinomycètes sur le milieu Bennett diffère d'une souche a une autre.

La souche SP20 se développe plus rapidement, on observe la présence des colonies jaunes au bout de 2 à 3 jours. Après 7jours d'incubation les colonies perdent leurs pigmentations jaunes qui se propagent dans le milieu, les colonies en suite prennent la couleur blanche. Les autres souches d'actinomycètes SP22, SP23, SP24, et SP27 ont montré une croissance lente (6 à 7jours), La pigmentations diffère d'une souche a une autre (gris, marron, beige).

Les souches se développent sur le milieu Bennet avec différents degrés de croissance allant d'une croissance faible SP24, SP 27 à une croissance abondante SP20, SP22, et SP23. Les colonies adhèrent fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspensions SP20.

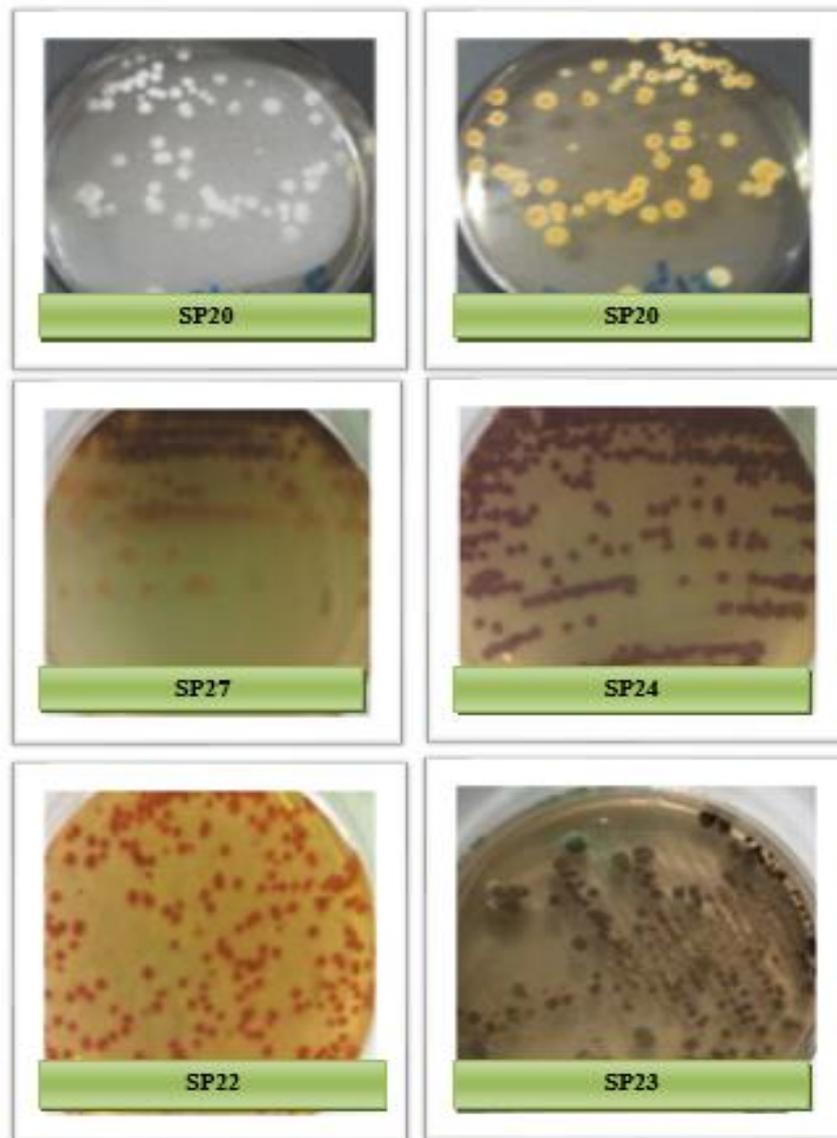
L'observation direct des colonies d'actinomycètes, permet de déterminer la couleur du mycélium de substrat. En effet, pour toutes les souches, ce mycélium est pigmenté soit en crème, jaune, brun (Figure6).

## Résultats et discussion

**Tableau 10** : Tableau synthétique des différents caractères macromorphologiques des 5 souches d'actinomycètes

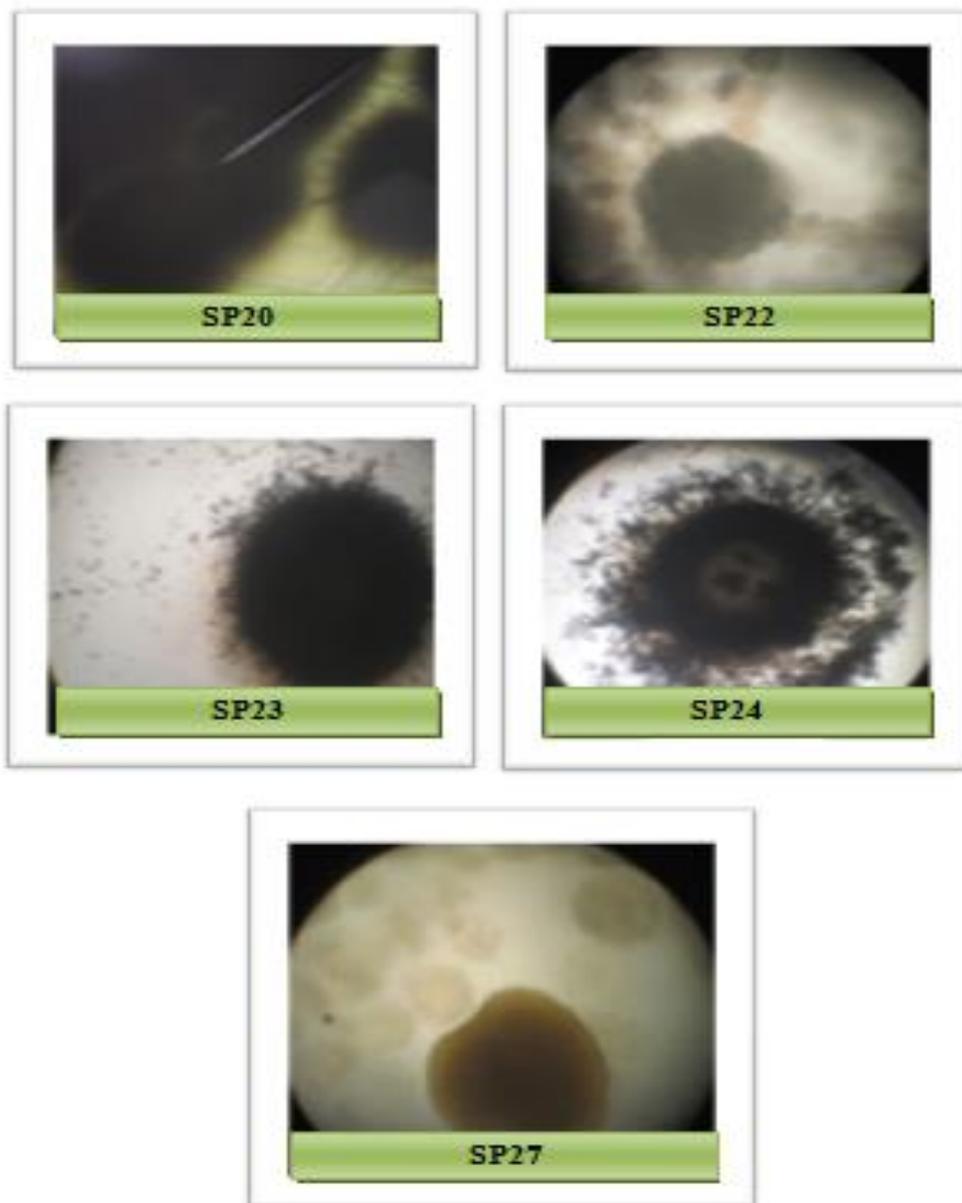
Caractères Souches	Plan	Surface	Bords	Elévation	couleur	consistance	filaments	Pigments diffusable
SP20	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Bossue	Jaune / blanche	sèche	+	+
SP22	Circulaire	Lisse	Irréguliers	Convexe	Marron	sèche	+	-
SP23	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Convexe	Gris	Sèche	+	-
SP24	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Cratère	Beige et virent vers le marron	Sèche	+	-
SP25	Circulaire	Vagues concentrique	Réguliers	Bossue	Beige	Crémeuse	+	+

+ Présence ; - Absence



**Figure 6 :** Photos des cinq souches d'actinomycètes sur les milieux Bennett observés à l'œil nu.

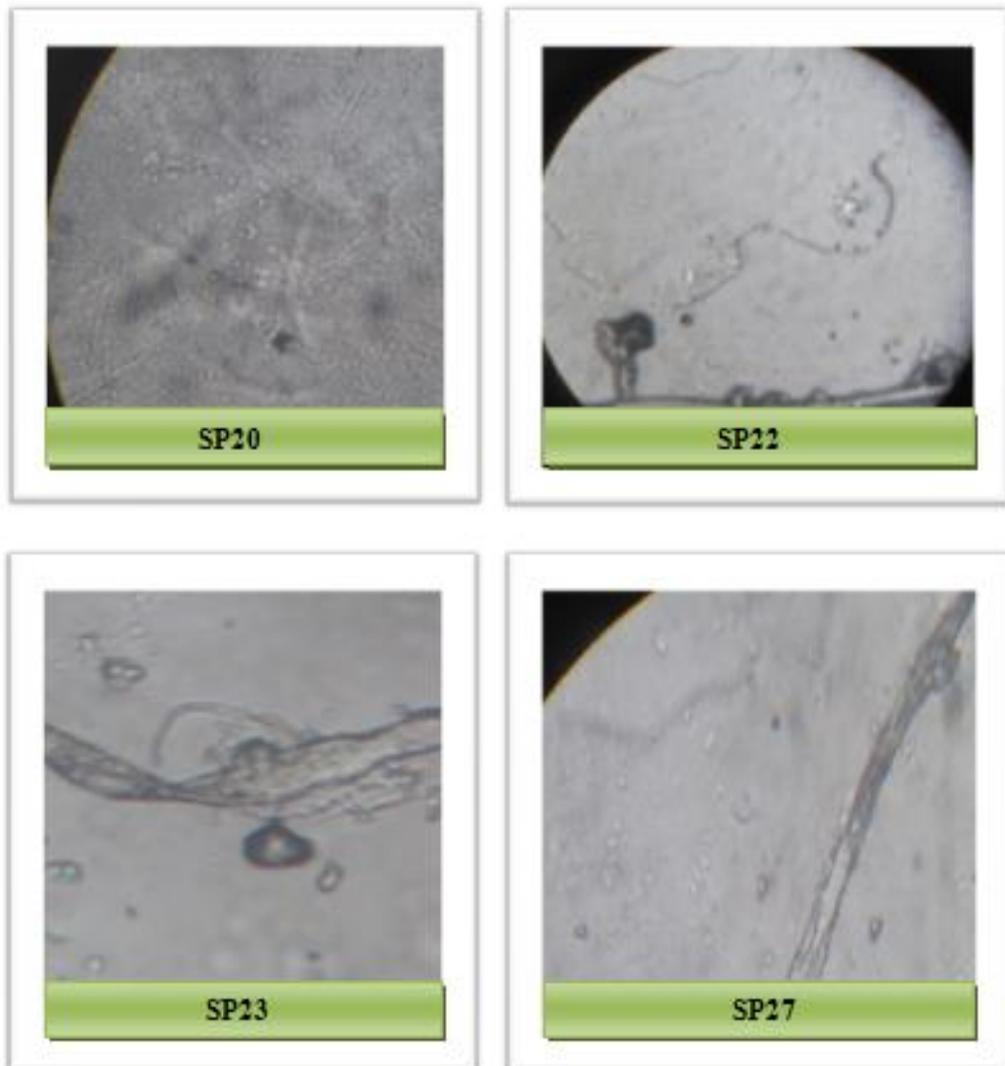
L'aspect macroscopique des souches est différent. Certains forment des colonies de Grande taille SP23, SP24 d'autres de taille moyenne SP22 et certains d'autres forment des colonies de petite taille SP20, SP27. La forme des colonies était différente aussi : colonies, bossues, convexes, cratères. Les colonies sont rondes à contours irréguliers à l'exception la souche SP27, la figure 7 suivante montre les différentes souches d'actinomycètes observées sous microscope optique au grossissement ( $G \times 10$ ).



**Figure 7 :** Les souches d'actinomycètes observées sous microscope optique au grossissement (Gx10).

L'aspect microscopique indique que :

- Les cinq souches d'actinomycètes sont positives à la coloration de Gram ce qui les rapprochent aux actinomycètes.
- Les souches ont un aspect filamenteux, parfois fragmenté.
- La présence des spores dans tous les frottis observés



**Figure 8 :** Observation microscopique(Gx100) des frottis d'actinomycètes cibles.

L'observation microscopique indique que nos souches cibles sont à coloration positive en effet les travaux réalisés par (WILLIAMS *et al.*, 1993 ; SANGLIER et TRUJILLO, 1997) montrent que les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram positive. Ce qui nous laisse supposé que nos souches observées sont des actinomycètes.

L'étude des caractéristiques morphologiques macroscopiques et microscopiques des souches actinomycétales est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes. Par exemple, la présence ou l'absence des spores sur le mycélium de substrat ou la formation de sporanges, permettent de différencier plusieurs genres. Ainsi, la morphologie, la coloration

## Résultats et discussion

---

des colonies, la présence ou l'absence d'hyphes aériens fournissent une indication sur le genre (SAUBOLLE et SUSSLAND, 2003).

En plus des caractères morphologiques, les colorations cellulaires, les caractères biochimiques et physiologiques sont d'une grande importance dans la caractérisation des genres d'actinomycètes avec une plus grande précision (BOIRON *et al.*, 1993; CARLOTTI *et al.*, 1994).

Selon SHIRLING et GOTTLIEB (1976), l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (WILLIAMS *et al.*, 1993).

La croissance des actinomycètes est plus lente que celle des autres bactéries ; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (OTTOW et GLATHE, 1968 ; LARPENT et SANGLIER, 1989).

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés . Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris (PERRY *et al.*, 2004).

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (EUNICE et PROSSER, 1983) constituées d'hyphes c'est-à-dire des filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance. (GOTTLIEB, 1973 ; LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1981 ; EUNICE et PROSSER, 1983).

### II-Criblage des souches d'actinomycètes

#### 1-Mise en évidence de l'activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar

L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle permet de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les bactéries tests utilisées. Le tableau ci-dessous montre les diamètres des zones d'inhibition de cinq souches d'actinomycètes vis-à-vis des bactéries cibles.

**Tableau 11** : Diamètre des zones d'inhibition (mm) des souches d'actinomycètes contre les germes cibles. Le diamètre des cylindres d'agar est inclus dans la moyenne.

Souches tests / Germes cibles	SP23	SP27	SP20	SP22	SP24	Oxytétracycline (Témoin positif)	Ampicilline (Témoins positif)
<i>E.coli</i> ATCC	31±1	13±3	8±0	27±1	8±0	26±0	15±0
<i>E.coli</i>	32±0	13±1	8±0	25±2	37±3	23±0	08±0
<i>S.aureus</i> ATCC	27±0	23±2	15±3	8±0	33±1	27±0	07±0
<i>S. aureus</i>	50±1	28±1	15±3	20±1	25±0	22±0	11±0
<i>P.aeruginosa</i>	46±2	18±31	12±3	46±2	8±0	09±0	06±0
<i>K.pneumoniae</i>	18±1	12±3	17±2	8±0	14±1	15±0	06±0

(Ø= moyenne ±écart type), n=2 (nombre de répétitions).

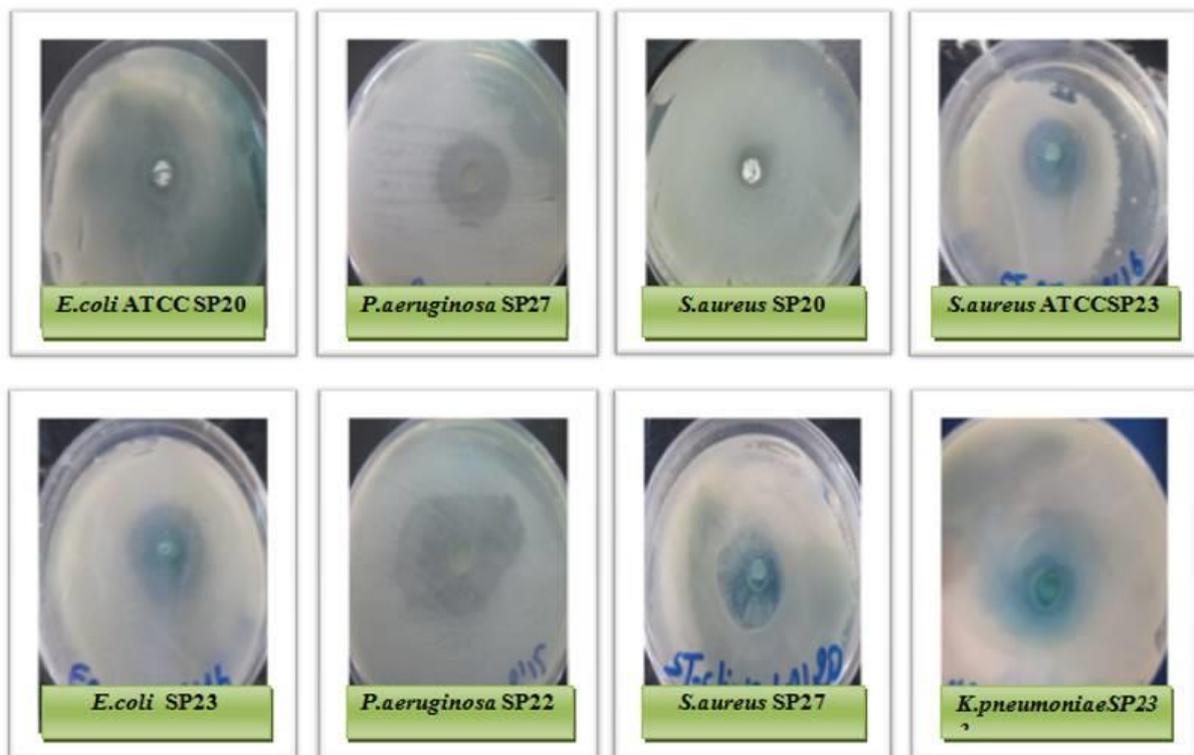
08mm : Absence de zones d'inhibition, 6mm : Diamètre des disques d'antibiotiques des témoins positifs.

## Résultats et discussion

La souche SP22 exerce un effet antagonisme vis-à-vis des toutes les bactéries tests à l'exceptions de *S.aureus* ATCC et *K.pneumoniae* Les plus grandes zones d'inhibition obtenues sont de diamètre de 50 et 46 mm contre *Staphylocoque* et *P. aeruginosa* respectivement. En revanche le plus faible diamètre de 18 mm a été obtenue contre *K. pneumoniae*.

Pour les souches SP27 et SP20 les plus grandes zones d'inhibition obtenues de diamètre de 28 et 17 mm contre *S.aureus* et *K.pneumoniae* respectivement. Pour la souche SP24 la plus grande zone d'inhibition obtenue avec *E.coli* est de diamètre de 37 mm, aucun effet antagonisme n'est marqué avec *E.coli* ATCC et *P. aeruginosa*.

Toutes les bactéries cibles présentent une sensibilité importante contre l'antibiotique utilisé comme témoin positif (oxytétracycline). Les deux souches à Gram négatif *P.aeruginosa* et *K.pneumoniae* résistent à l'ampicilline.



**Figure 9 :** Résultats de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes  
Vis-à-vis des souches bactériennes cibles.

## Résultats et discussion

---

Les actinomycètes constituent une source intéressante de substances bioactives, notamment les molécules antimicrobiennes. Le criblage des souches d'actinomycète d'origine terrestre présente une nouvelle voie de recherche d'antimicrobiens naturels. La plupart des criblages concernant la recherche des substances antimicrobiennes à partir des souches d'actinomycètes ont été effectués sur des échantillons du sol.

Depuis, la découverte de la Streptomycine par l'équipe de Waksman en 1943 à partir de bactéries du sol du genre *Streptomyces* et l'isolement de la nystatine, premier antibiotique antifongique, par HAZEN et BROWN en 1951 à partir de *Streptomyces noursei* provenant aussi du sol, plusieurs recherches ont été entreprises sur des souches d'actinomycètes d'origine terrestre. Différents types de sol (forêts, boue, lac), même des milieux extrêmes (désert), ont été explorés dans l'espoir de découvrir de nouvelles souches produisant des produits nouveaux (OSWALD *et al.*, 1968; HACENE *et al.*, 1994; CHIBA *et al.*, 1999; HWANG *et al.*, 2001; LEE et HWANG, 2002 ; MEKLAT *et al.*, 2011, SUELA SILVA, 2013).

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes bien que son rendement soit réduit, il est pratiqué par de nombreux laboratoires. Ceux-ci se sont efforcés de diversifier les sources de microorganismes en faisant appel à des échantillons provenant des habitats les plus extrêmes (LARPENT *et al.*, 1989, OUHDOUCH *et al.*, 2001, KHETTABI *et al.*, 2002, LEMRISS *et al.*, 2003).

Toutes les actinomycètes cibles de ce travail ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un microorganisme test utilisé. En effet plusieurs travaux ultérieurs ont corroboré le pouvoir antibactérien remarquable de ces bactéries (MCKENZIE *et al.*, 2010 ; MYTHILI et AYYAPPA, 2011 ; NG et AMSAVENI, 2012).

VALLI *et al.* (2012) ont isolé 21 souches d'actinomycètes à partir d'un échantillon prélevé du bord de la mer (seashores) où tous les isolats étaient capables de produire des substances antimicrobiennes.

AMEUR et GHOUL *et al.* (2012) ont isolé sept actinomycètes à partir d'un échantillon du sol de Sétif (Algérie) dont une (appartenant au genre *Streptomyces*) possède une activité antimicrobienne intéressante.

## Résultats et discussion

---

Des résultats similaires sont mentionnés par ŞAHIN et UCUR (2003) où deux souches parmi les 15 souches de *Streptomyces* isolées du sol sont actives avec des zones d'inhibition entre 10 et 20 mm de diamètres. Le même résultat est rencontré dans les travaux de OSKAY *et al.* (2004) où sur un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie, seulement deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition entre 15 et 26 mm.

D'après KATTERE et ANDREN (2001), le nombre et l'activité des microorganismes changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs.

De nombreuses actinomycètes telluriques produisent des antibiotiques et jouent donc le rôle d'antagonistes (STEVENSON, 1956). Les *Streptomyces* sont largement étudiés en raison de leur pouvoir de produire une large gamme d'antibiotiques (PINET et DEMAIN, 1988). Selon DENIZCI (1996), sur 356 espèces de *Streptomyces* isolés, 36% des isolats possèdent des activités antibactériennes contre *Staphylococcus aureus* (20,78%), et *E. coli* (2,52%).

Les résultats de l'effet des substances bioactives produites par des actinomycètes isolés à partir d'échantillons d'eau, de sol et d'écorces d'arbres du nord-est de l'Algérie montrent que deux souches parmi les 14 testés sur *P. aeruginosa* par la méthode des disques présentent des zones d'inhibition supérieure à 11 mm (KITOUNI *et al.*, 2005).

Les souches actinomycètes isolées présentent une activité antibactérienne et trois d'entre elles possèdent une activité antifongique. Cependant, l'apparition et les valeurs des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à un autre et varient, sur le même milieu de culture, d'une bactérie-test à une autre (KITOUNI *et al.*, 2005).

La majorité des actinomycètes isolés (Sj32, Sj38, Sj45, Sj68 et S1(2)) produisent des substances antibactériennes contre les bactéries à Gram positif testées. Parmi les autres isolats doués d'activité antimicrobienne, quatre (Sj33, Ss3, S2(2) et S2(4)) ont un large spectre d'action

## Résultats et discussion

---

puisqu'ils inhibent la croissance des bactéries Gram positif testées et d'*E.coli* et aussi celle de *C. albicans* (JIHANI.2013).

En effet, les bactéries Gram négatif ont une membrane extérieure constituée de polysaccharides, ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles; contrairement aux bactéries Gram-positif, qui n'ont qu'une couche de peptidoglycane externe qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (SCHERRER *et al.*, 1971).

Les bactéries Gram+ testées sont les plus sensibles aux antibactériens produits par les actinomycètes étudiées. Tandis que sur les sept microorganismes tests étudiés, *P.aeruginosa* 76110 apparaît comme la souche la plus résistante puisque sa croissance n'est inhibée par aucune des 20 souches d'actinomycètes isolées. Ceci n'est pas surprenant car cette espèce est connue pour sa résistance naturelle et acquise à plusieurs substances antimicrobiennes (STOVER *et al.*, 2000).

Des travaux, publiés dans la revue Nature, révèlent la découverte d'une nouvelle classe d'antibiotique dont la platensimycine, active contre un Staphylocoque ATCC(WANG, 2006).

Cet antibiotique est produit à partir d'une nouvelle souche de *Streptomyces platensis* isolée du sol de l'Afrique du sud.

Les microorganismes marins produisent de nombreux antibiotiques, parmi lesquels certaines espèces sont impliquées dans la synthèse de nouvelles classes thérapeutiques (WILLIAMS, 2009). *Streptomyces* sp. MADO2 et *Nocardiosis* sp. MADO3 sont doués d'activités antimicrobiennes contre les souches pathogènes testées. *Nocardiosis* sp. VITSK5 (FJ973467) isolé à partir des sédiments marins collectés (Inde) est actif contre les bactéries à Gram négatif : *E. coli* (20 mm), *P. aeruginosa* (18 mm) et *K. pneumonia* (15 mm) et à Gram positif *S. aureus* (6 mm). Son activité antifongique est importante vis-à-vis de *A. niger* (12 mm) (VIMAL *et al.*, 2009).

L'activité antimicrobienne de ces souches doit être testée contre d'autres microorganismes et sur d'autres milieux de culture. En fait, il est maintenant bien établi que la composition du milieu de culture peut affecter la production d'antibiotiques par les actinomycètes (SINGH *et al.*, 2009).

## Résultats et discussion

---

LOUNES *et al.* (1995) ont montré que les sources de carbone lentement assimilables permettent une plus grande production d'antibiotiques alors que d'autres études ont montré que le glucose provoque la répression de la formation de plusieurs aminoglycosides produits par les actinomycètes (streptomycine, la kanamycine, la néomycine et istamycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (DEMAIN, 1989 ; PIEPERSBERG et DISTLER, 1997).

### 2-Mise en évidence de l'activité antifongique sur milieu solide par la technique des cylindres d'agars

Un criblage préliminaire pour la recherche d'activité antifongique a été effectué sur 5 souches d'actinomycètes préalablement retenues sur la base de leurs caractéristiques morphologiques jugées intéressantes. La technique utilisée pour la mise en évidence des antagonismes est celle des cylindres d'agar. Les résultats montrent un antagonisme intéressant à l'égard des champignons utilisés *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Le tableau ci-dessous montre les résultats obtenus.

**Tableau 12** : Diamètres des zones d'inhibition obtenues en (mm) vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

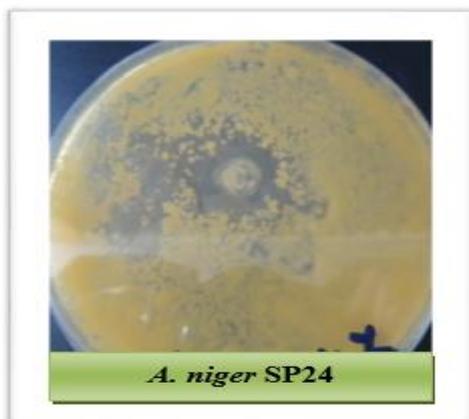
Champignons	<i>Candida albicans</i>	<i>Aspergillus niger</i>
Souches tests		

## Résultats et discussion

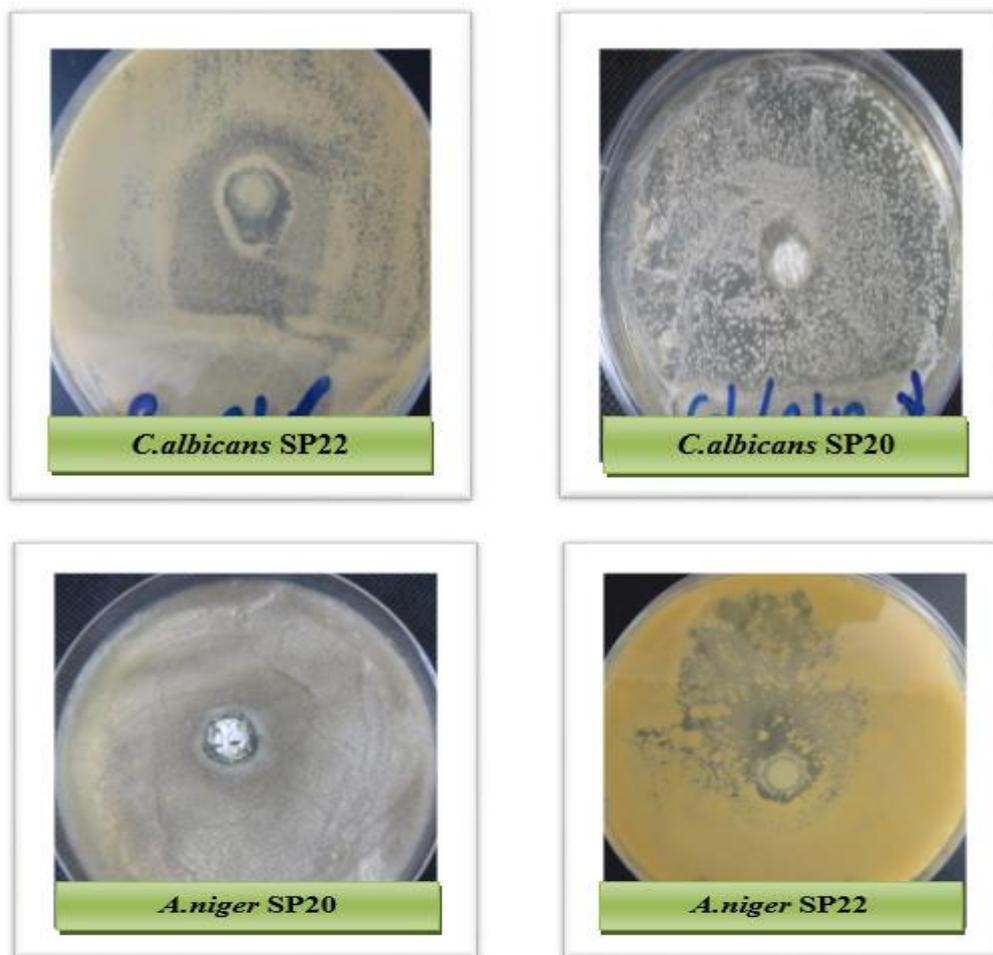
SP23	14±1	36±1
SP27	8±0	8±0
SP20	15±2	13±2
SP22	27±1	16±3
SP24	12±1	16±0
Amphitrécyne B (Témoin positif)	24±0	30±0

(Ø= moyenne ±écart type) n=2 (nombre de répétitions),8mm=Absence de zones d'inhibition.

A partir de ce tableau, on constate que les zones d'inhibition les plus importantes à l'égard des germes cibles sont obtenues avec les souches SP23 et SP22 contre *Aspergillus niger* (36mm) et *Candida albicans* (27mm) respectivement. La plus petite est obtenue avec la souche SP24 vis-à-vis de *Candida albicans*. On remarque aussi que la souche SP27 ne montre aucun antagonisme vis à vis des germes utilisés.



## Résultats et discussion



**Figure 10** : Résultats de l'activité antifongique des souches d'actinomycètes tests vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

L'analyse statistique par le test ANOVA a révélé une P-valu  $> 5\%$ , l'activité antifongique ne montre aucune différence significative par ailleurs les souches étudiées ont une activité similaire contre les germes cibles. Les résultats sont illustrés dans l'annexe 7.

Les réactions d'antagonisme qu'exercent les actinomycètes sur les champignons peuvent provenir de la production directe d'un antibiotique ou d'une enzyme dégradante (BAKER et COOK 1974).

L'évaluation, de l'activité anti-Candida révèle des zones d'inhibitions entre 07 et 21 mm pour les souches SP23, SP20, SP22 et SP24 testés. D'après les résultats des expériences réalisées par LEMRISS *et al.* (2003) et SLAVICA *et al.* (2005) par la méthode des cylindres

## Résultats et discussion

---

d'agar, des souches appartenant au genre *Streptomyces* montrent des zones d'inhibition (11-31mm) vis-à-vis de *C.albicans*.

Dans les travaux de HILALI *et al.* (2002), les résultats d'un criblage initial de 85 souches d'actinomycète isolées à partir du milieu naturel (sol, eau et sédiments marins) montrent que 25 souches (29,41 %) ont une activité vis-à-vis au moins un des germes cibles suivants : bactéries et/ou champignons pathogènes (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* R2, *Fusarium culmorum* et *Fusarium graminearum*).

L'activité antifongique des souches d'actinomycètes isolées a été mise en évidence sur milieu de culture Bennett par deux techniques de diffusion sur gélose. Parmi les 29 souches d'actinomycètes isolées, 25 (86,20 %) ont montré une activité antifongique vis-à-vis d'au moins un champignon étudié. Les extraits des trois actinomycètes représentatifs ont montré une activité inhibitrice intéressante, surtout la souche SP13' qui s'est révélée plus efficace et présente une intense activité antifongique (BOUSSABER,2012)

Généralement, l'activité antifongique est prédominante chez des actinomycètes isolés de milieux acides (PETROSYAN *et al.*,2003), ceci est en accord avec nos résultats concernant les souches à activité antifongique, ces dernières sont toutes isolées de l'échantillon dont le pH relativement acide(pH=5,6).

D'après le travail fait par BOUDEMAGH (2007), 171 souche actinomycétales ont été isolées et purifiées dans cette étude. Parmi cette microflore, 17 souches soit 10 % de cette population ont montré des activités antifongiques contre au moins un champignon test.

Plusieurs études ont également montré une grande variabilité des résultats des tests d'activité antifongique en fonction de la méthodologie (CADET *et al.*, 1996 ; KAUFFMAN et CARVER, 1997; KANG *et al.*, 2010 ; MENDES *et al.*, 2013).

Selon le diamètre des zones d'inhibition ainsi que les spectres d'activité, le test a révélé que les souches SP22 et SP23 présentent une activité antimicrobienne importante. D'ou l'intérêt

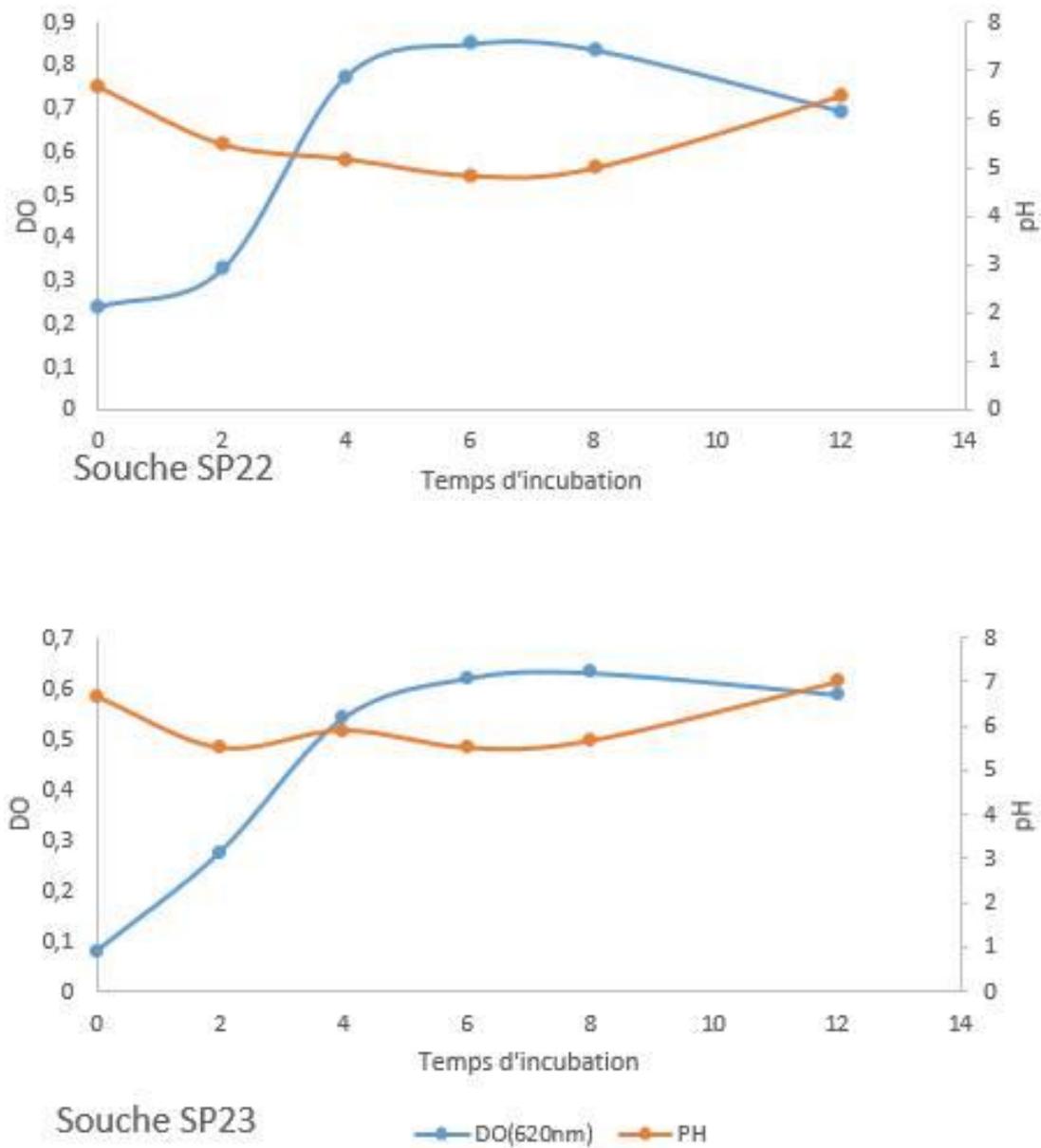
de réaliser des cultures dans des milieux liquide pour ces dernières, afin de sélectionner les souches productrices des molécules bioactives.

HACENE *et al.* (1994) ont trouvé que sur 286 souches d'actinomycètes isolées de différents écosystèmes du Sahara algérien, seulement 32 souches (11,19 %) ont montré une activité contre au moins un germe cible parmi quatre bactéries, deux levures et plusieurs champignons filamenteux.

### **III-Cinétique de croissance des souches SP22 et SP23**

La cinétique de croissance des deux souches d'actinomycètes SP22 et SP23 ont été étudiés afin de déterminer la densité optique et la mesure du pH. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure11.

## Résultats et discussion



**Figure 11 :** Cinétique de croissance des souches SP22 et SP23.

Temps d'incubation en jours

Les deux souches d'actinomycètes SP22 et SP23 révèle une croissance rapide, avec la présence de toutes les phases de croissance à l'exception de la phase de latence qui est inexistante pour la souche SP23, justifiée par l'adaptation de l'inoculum au milieu de culture (pré culture).

## Résultats et discussion

---

Pendant les 4 premiers jours de culture la DO augmente rapidement pour atteindre la valeur 0,776 pour la souche SP22 et 0,542 pour la souche SP23 c'est la phase exponentielle. Cette phase est marquée par une acidification des deux milieux de culture qui peut être expliquée par une libération d'acides organiques.

La croissance tendent à ralentir durant l'intervalle (4-8) jours .Cette phase est caractérisée par une période de faible croissance des deux souches accompagnée d'une faible augmentation du pH qui est probablement due à la dégradation des sources azotées.

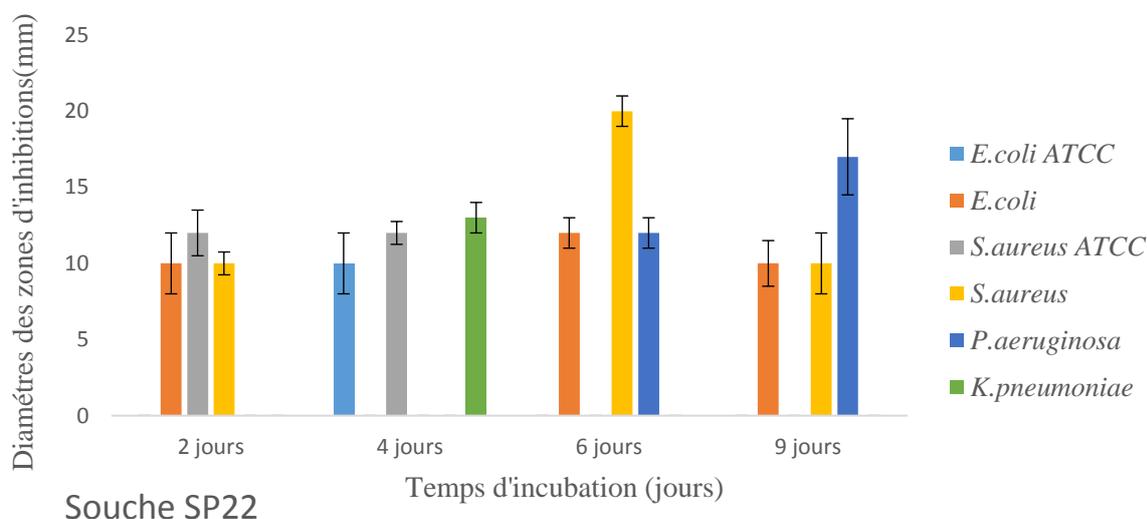
A partir de 8<sup>ème</sup> jours, les souches SP22 et SP23 entre dans la phase de déclin. On observe la diminution de la DO de la culture et le pH remonte progressivement pour se rapprocher de la neutralité en fin de culture qui est due à la dégradation des sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium ( STRUB ,2008).

La courbe de croissance de la souche ITA 1X est caractérisée par une absence de la phase de latence : elle peut être obtenue en adaptant l'inoculum sur le même milieu (préculture) et en augmentant sa taille (GUIRAUD, 2007).

Selon MARTIN et MCDANIEL.(2005) ,le dosage des acides nucléiques représente l'une des techniques les plus favorables permettant de suivre la croissance avec plus de précision chez les microorganismes filamenteux.

### IV- Suivi de la production de molécules bioactives par les souches d'actinomycètes

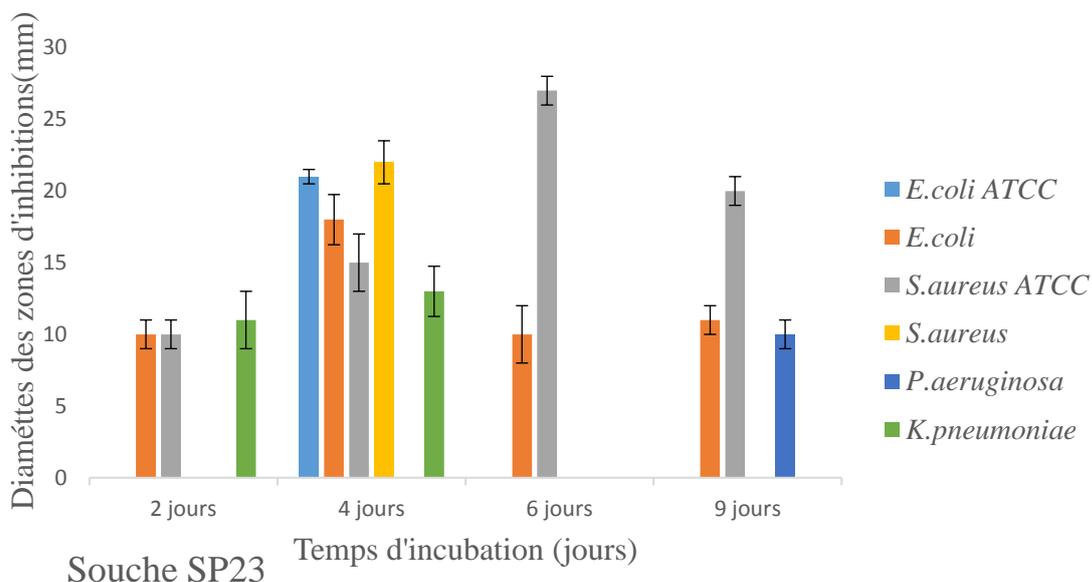
La production de molécules bioactives par les souches SP22 et SP23 a été déterminée par des tests antibactériens à différents temps d'incubation. Les résultats obtenus sont illustrés dans la figure ci-dessous.



**Figure 12 :** Production de molécules bioactives par la souche SP22 en fonction du temps d'incubation.

L'activité antibactérienne de la souche SP22 vis-à-vis des germes *E.coli* ATCC et *K.pneumoniae* apparaît qu'au 4<sup>ème</sup> jour. Elle est présente dès les deux premiers jours d'incubation contre les quatre autres germes. L'effet antagoniste des molécules bioactives produites par la souche SP22 est maximum au 6<sup>ème</sup> et 9<sup>ème</sup> jours avec des zones de lyse très importantes 20 mm contre *S. aureus* (6<sup>ème</sup> jours), 17 mm contre *P.aeruginosa* (9<sup>ème</sup> jours).

## Résultats et discussion



**Figure 13 :** Cinétique de production de molécules bioactives par la souche SP23 en fonction du temps d'incubation.

La souche SP23 présente une activité antibactérienne durant toute la période d'incubation contre les germes *E.coli* et *S. Aureus* ATCC. Les plus grandes zones d'inhibition obtenues ont un diamètre de 27mm avec *S.aureus* (6<sup>ème</sup> jours) et de 18mm avec *E.coli* au 4<sup>ème</sup> jours d'incubation. L'activité contre *P. aeruginosa* n'apparaît qu'au 9<sup>ème</sup> jours (10mm). En ce qui concerne le germe *K.pneumoniae* il est sensible de 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jours avec des zones d'inhibition de 10 et 13mm respectivement.

L'activité antagoniste des molécules bioactives élaborées par la souche SP23 est au maximum au 4<sup>ème</sup> jours avec des zones d'inhibition de diamètres de 21 mm et 22 mm contre *E.coli* ATCC et *S.aureus* respectivement et absente dans les autres jours.

D'après les résultats obtenus, on constate que la souche SP22 produit des métabolites actifs durant toute la période d'incubation, avec une grande zone d'inhibition marquée contre *S.aureus* ATCC au 6<sup>ème</sup> jours (phase exponentielle), par contre la souche SP23 montre une meilleure production au 4<sup>ème</sup> jours avec une activité importante et cela contre 5/6 de nos germes cibles, de même la plus grande zone d'inhibition est obtenue contre *S. aureus* (6<sup>ème</sup> jours).

## Résultats et discussion

---

Selon KITOUNI *et al.* (2005) le milieu de Bennett est le meilleur milieu de production d'antibiotiques pour l'ensemble des actinomycètes du point de vue quantitative. Cette propriété s'explique d'avantage par le fait que le milieu de Bennett est riche en substrats carbonés (comme le glucose) et en substrats azotés (casaminoacides, extrait de levure et extrait de viande).

La plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques sont hétérotrophes et exigeant des composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Les sources de carbone telles que l'amidon de maïs, le glucose, le fructose, le saccharose et la mélasse qui sont rapidement assimilés sont couramment utilisés comme substrats de croissance pour produire des métabolites secondaires par fermentation (SANCHEZ ET DEMAIN, 2002 ; PAPAGIANNI, 2004). Le glucose est généralement la meilleure source de carbone et d'énergie pour la croissance de nombreux microorganismes producteurs d'antibiotiques (PARK *et al.*, 1994).

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la synthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. Le niveau de production des métabolites secondaires, notamment chez les actinomycètes, dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponibles et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. Ces deux leviers de régulation du métabolisme secondaire sont influencés par de nombreux paramètres, entre autres nutritionnelles et physico-chimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers (STRUB, 2008).

les concentrations les plus élevées sont atteintes en fin de phase stationnaire. Selon BU 'LOCK (1975), les métabolites secondaires sont généralement formés lorsque le taux de croissance des microorganismes atteint une valeur seuil, le plus souvent faible. TRILLI *et al* (1987), ont démontrés qu'en culture continue, la synthèse d'un antibiotique est optimale si le taux de croissance est maintenu entre 50 et 80% du taux de croissance maximal de la cellule. En effet, de nombreuses études ont révélés que les production d'antibiotiques tel que la Céphamycine C de *Streptomyces cattleya* et l'actinorhodine chez *Streptomyces coelicolor*

## Résultats et discussion

---

sont soumises à une régulation par un faible taux de croissance (DOULL et VINING, 1990 ; LILLEY *et al.*, 1981).

Au début de la phase de croissance (Trophase), la plupart des micro-organismes sont sensibles à leur propre antibiotique. Toutefois, au cours de production (Idiophase), ils deviennent physiologiquement résistants à l'antibiotique qu'ils produisent. La faible production de métabolites en phase exponentielle pourrait également s'expliquer par une limitation en précurseurs pendant cette phase. La production des métabolites secondaires étant sous l'influence du métabolisme primaire (DREW et DEMAIN, 1977). Les cinétiques de croissance et de production montrent également une distinction entre la trophophase et l'idiophase qui est une caractéristique des actinomycètes où la phase de production est découplée de la phase de croissance. Ce même résultat a été observé chez de nombreuses espèces de *Streptomyces* dont *S. ambofaciens* (KHAOUA *et al.*, 1992).

### **V-Extraction de molécules bioactives par les solvants organiques**

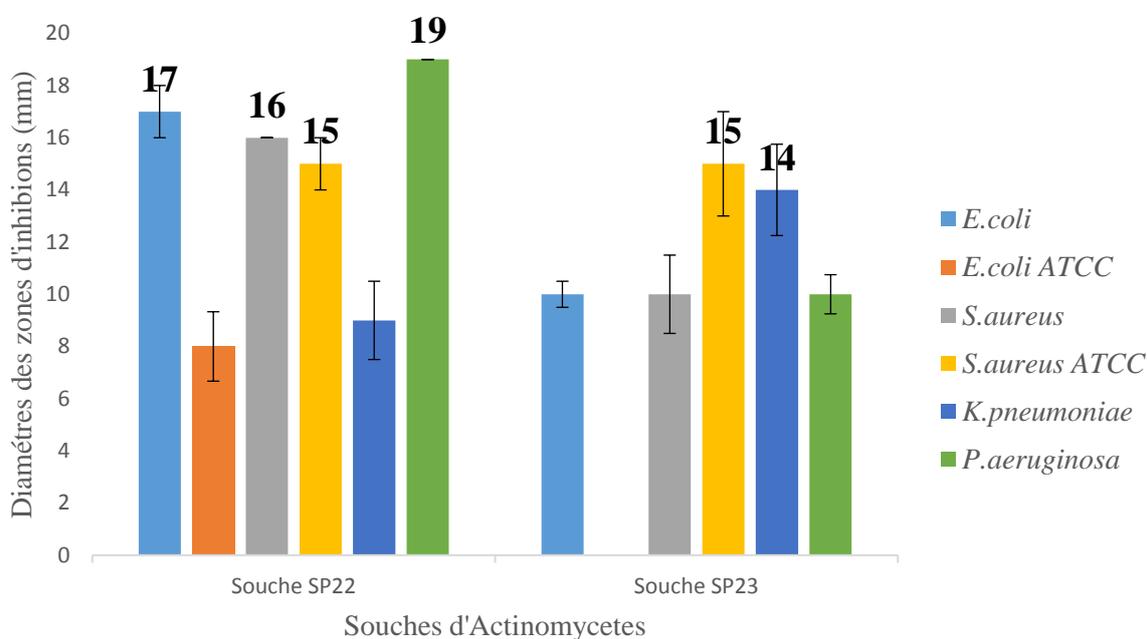
Le principe de l'extraction par les solvants organiques se résume en une séparation du surnageant en deux phases ; une phase organique et une phase aqueuse et de faire passer les molécules bioactives dans la phase organique. Le choix du solvant dépend de la stabilité des substances antimicrobiennes dans le solvant lors de l'extraction (ZOUAGHI, 2007).

Trois systèmes de solvants organiques de polarité différente ont été utilisés pour extraire les substances antimicrobiennes dans le surnageant et le culot ; il s'agit du Méthanol, l'acétate d'éthyle et n-hexane. Ces extraits sont testés pour leur activité antibactérienne et antifongique par la technique des disques en papier (BOUDEMAGH, 2007).

#### **1-Extraction des molécules bioactives à partir du mycélium**

## Résultats et discussion

Les résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du mycélium vis-à-vis des bactéries tests sont représentés dans le tableau (Annexe5) et le diamètre des zones d'inhibition de ce dernier sont représentés dans la figure ci-dessous



**Figure 14 :** Résultat de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des souches SP22 et SP23 vis-à-vis des germes cibles.

La souche SP22 est la plus performante par une activité antibactérienne très importante contre *P. aeruginosa* (gram négatif) avec une zone d'inhibition de 19mm de diamètre, suivie par une zone d'inhibition de 17mm contre *E. coli*. La plus petite zone d'inhibition est observée contre la bactérie *E. coli* ATCC (8 mm).

Une activité antibactérienne plus ou moins importante de la souche SP23, la plus grande zone d'inhibition est obtenue contre *S. aureus* (Gram positif), absence d'activité vis-à-vis de *E. coli* ATCC (Gram négatif). Cela, peut-être attribué à la différence morphologique qui existe entre les deux types bactériens (Gram positif et Gram négatif).

En effet les bactéries de coloration de Gram négatif portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS). Ce qui rend leurs parois

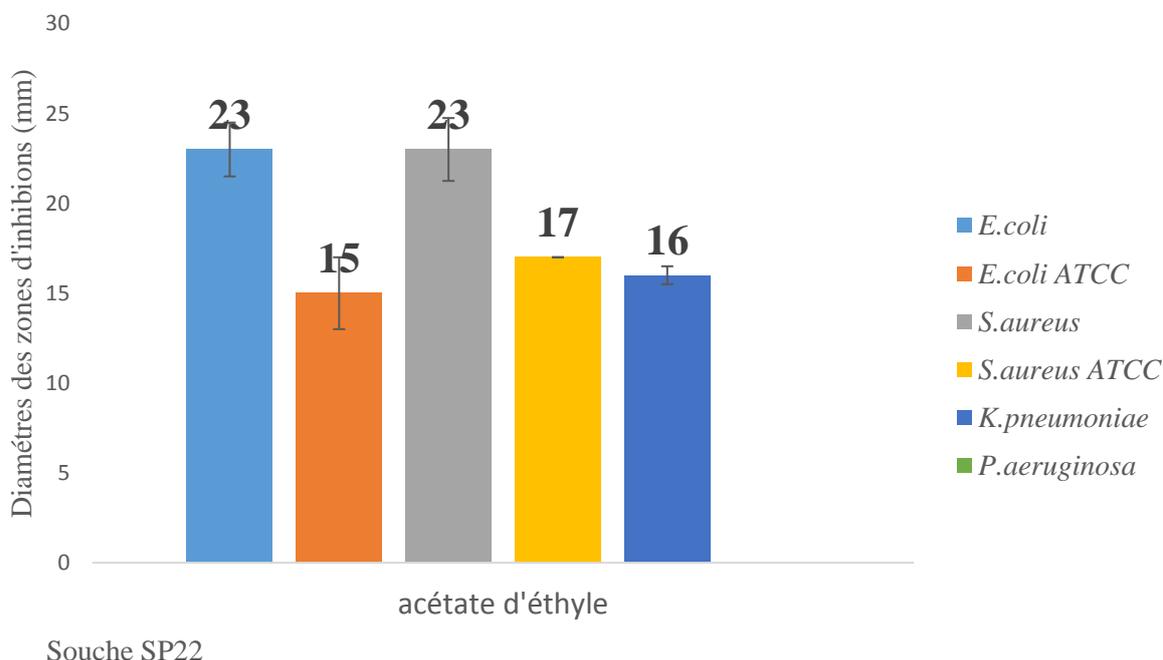
## Résultats et discussion

impermeables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries de coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (SATEESH *et al.*, 2011).

Plusieurs chercheurs ont observé la résistance remarquable des bactéries à Gram négatifs par rapport à leurs homologues bactéries Gram positif (ULLAH *et al.*, 2012). CWALA *et al* (2011) ont testés l'activité antimicrobienne de l'extrait brut de quatre espèces appartenant à trois genres d'actinomycètes. Les résultats trouvés indiquent que les extraits sont plus actifs sur des bactéries de coloration de Gram positif que sur des bactéries décoloration de Gram négatif.

### 2-Extraction des molécules bioactives à partir du surnageant de culture

Les résultats des antibiogrammes des extraits de la souche SP22 et SP23, sont illustrés dans la Figure 18 et la figure 19 respectivement.

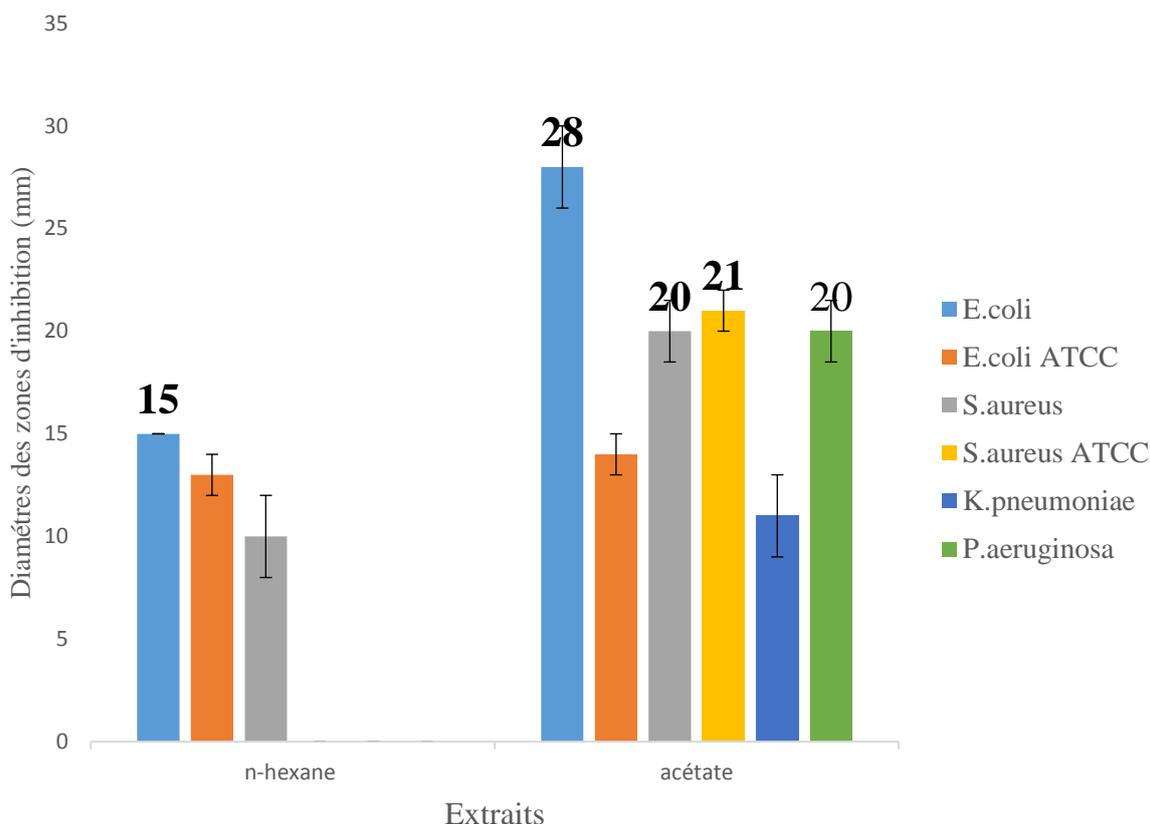


**Figure 15 :** Sensibilité des bactéries testées vis-à-vis des différents extraits organiques (Acétate d'éthyle ) de la souche SP22.

Pour la souche SP22, la plus petite zone d'inhibition est obtenue par des disques imprégnés par l'extrait d'acétate d'éthyle contre *E.coli* ATCC (15 mm), tandis que la plus

## Résultats et discussion

grande zone d'inhibition est obtenue par des disques imprégnés par le même extrait (acétate d'éthyle) contre les deux souches tests *E.coli* et *S.aureus* 30 mm, par contre l'activité est absente contre *Pseudomonas*(Figure 18). Les résultats indiquent que l'extrait n-hexane n'a pas montré d'activité antagoniste contre les bactéries testées.



**Figure 16 :** Sensibilité des bactéries cibles vis-à-vis des différents extraits organiques (Acétate d'éthyle et n-hexane) de la souche SP23.

Pour la souche SP23, les résultats montrent que l'acétate d'éthyle est actifs contre les 6 bactéries testées dont quatre à Gram négatif (*E. coli*; *K. pneumoniae*; *P. aeruginos*) et une à Gram positif (*S. aureus*).la plus grande zone est marquée contre *E.coli* avec un diamètre de 28 mm. Tandis que l'extrait n-hexane a été actif uniquement contre *E. coli*; *E. coli* ATCC; *S.aureus* avec des diamètres de 15,13,10 mm respectivement, en revanche aucune activité n'a été montré contre (*S.aureus*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*).

Les trois extraits du surnageant par solvants organiques sont actifs contre les deux bactéries-tests utilisées. Ainsi les molécules bioactives de la souche A9 sont solubles, à la

## Résultats et discussion

---

fois, dans le n-butanol, l'acétate d'éthyle et le benzène. Les zones de lyse les plus importantes ont été observées avec l'extrait d'acétate d'éthyle. L'activité antibactérienne de ces extraits a été mise en évidence par la technique des disques qui permet de concentrer les composés actifs contrairement à la technique des puits (KITOUNI,2008).

L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Il a été rapporté par MELLOULI *et al.* (2004), que pour *Streptomyces* TN58, la meilleure production de molécules bioactives est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm. Pour des agitations faibles de l'ordre de 100 rpm ou fortes au voisinage de 300 rpm, la production de biomolécules chute fortement. De plus, en milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement (HODGSON, 1992). Il existerait donc une possibilité de relation entre la sporulation de l'espèce et sa capacité à produire ces molécules antifongiques.

La comparaison des zones d'inhibition des souches d'actinomycètes actives sur le milieu liquide et solide, a montré que la production du métabolite antibactérien est plus importante sur le milieu liquide que sur le milieu solide. Ceci s'accorde avec le résultat de (SULTANA, 2002 ; HILALI, 2002 ; MELOULI, 2003 ; ZITOUNI, 2005 ; SLAVICA, 2005) qui ont montrés que la production d'antibiotique est meilleure sur le milieu de culture liquide, mais certaines espèces du genre *Actinomadura* ont la particularité de ne pousser que sur des milieux solides. En ce qui concerne la production d'antibiotique, il existe des exemples de souches d'actinomycètes poussant sur milieu liquide mais ne produisant de substances actives que sur milieu solide d'après certains auteurs (SHOMURA,1979 ; IWAI,1982 ; BADJI, 2005) ce qui nous a poussé à procéder au criblage sur les deux milieux liquide et solide.

L'apparition de l'activité antibactérienne dans l'extrait d'acétate d'éthyle, et de n-hexane, nous laisse supposer qu'il s'agit soit d'une ou de plusieurs molécules, chacune est solubles dans un solvant différent ou bien d'une ou de plusieurs molécules soluble dans des solvants variés.

## Résultats et discussion

---

Cette dernière hypothèse est plus probable puisque selon GUERNET et HAMON (1981), les antibiotiques dont la structure est généralement complexe comprennent des caractères entraînant une affinité pour des solvants très divers.

L'absence totale d'activité antimicrobienne apparente pour l'extrait n-hexane de la souche SP22, peut être justifier par la faible concentration d'antibiotique extraite par le n-hexane qui est inférieur à la concentration minimale inhibitrice (CMI). Par contre la faible activité de la souche SP23 peut être expliquer par une mauvaise extraction par le n-hexane due à une faible solubilité des molécules produites par la souche dans ce solvant.

Ces résultats nous permettent de conclure que l'acétate d'éthyle est le meilleur solvant pour l'extraction des substances bioactives produites par les deux souches SP22 et SP23 dans le milieu liquide.

Plusieurs auteurs ont montré que la production des antibiotiques ne se fait que sur les milieux solides et le passage au milieu liquide pose quelques problèmes, soit par l'arrêt de la synthèse des antibiotiques ou bien par une diminution de leur production (RADHIKA *et al.*, 2011 ; SHARMA *et al.*, 2011 ; SINGH *et al.*, 2006), ils expliquent cela soit par :

- La variation de la répartition des nutriments avec le temps de la fermentation alors que la distribution de ceci autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie que très peu (BADJI *et al.*, 2005).

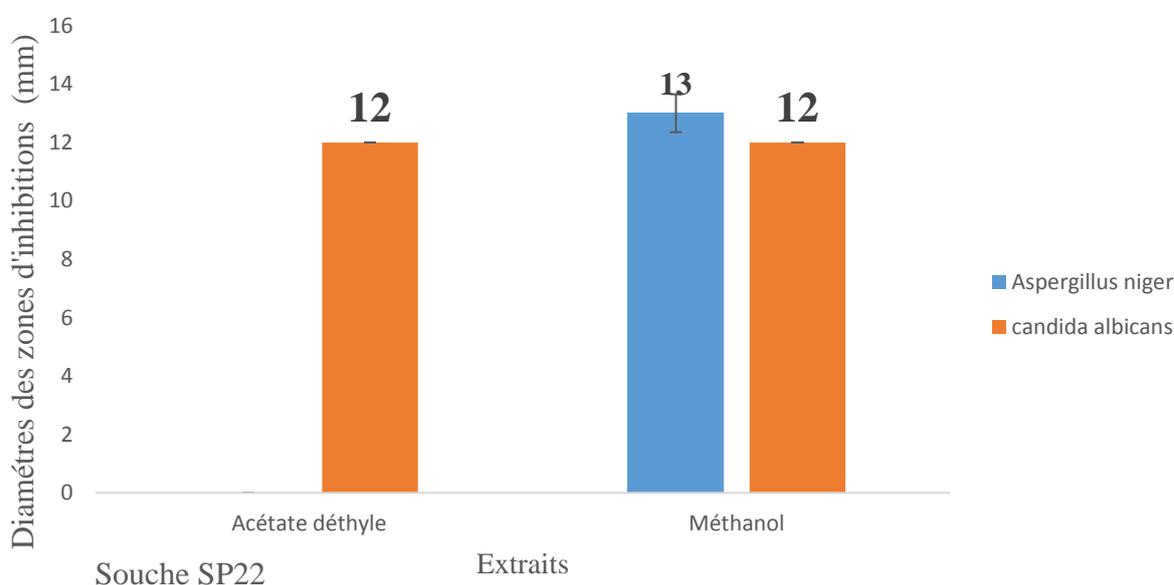
- Ou par la différence de la morphologie des actinomycètes lorsqu'ils évoluent respectivement dans le milieu liquide et solide (BUSHELL, 1993) ; Généralement la production des antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments de mycélium. En effet en milieu liquide et à cause de l'agitation, les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

## Résultats et discussion

Il faut noter que l'activité antibactérienne a été trouvée dans les extraits bruts des souches d'actinomycètes, obtenus à partir des cultures à la fois solide et liquide. Par ailleurs, il est reconnu que la production d'antibiotiques par les actinomycètes est plus efficace en milieu solide qu'en milieu liquide et de nombreuses souches sont incapables de produire des antibiotiques en culture liquide (IWAI et OMURA, 1982 ; SHOMURA *et al.*, 1979).

### 5-Evaluation de l'activité antifongique des extraits organiques

Les résultats du test de l'activité antifongiques des extraits organiques pour les deux souches cibles SP22 et SP23 sont illustrés dans les figures ci-dessous.



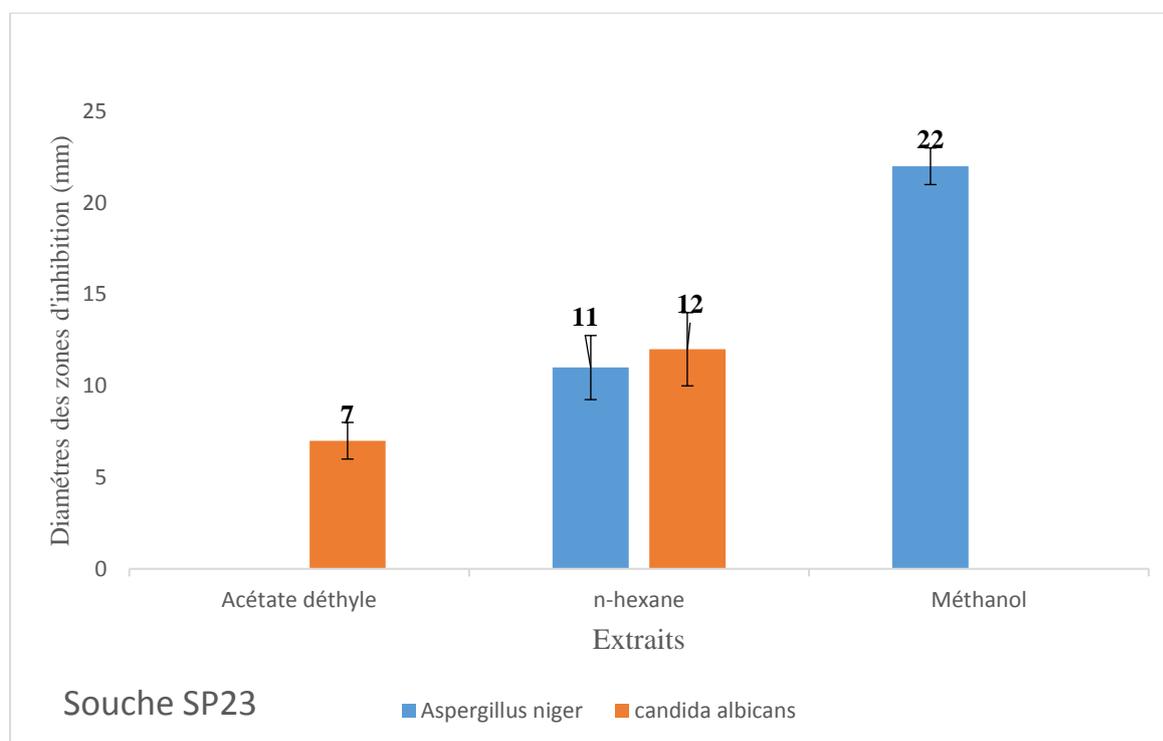
**Figure 17** : Activité antibiotique des extraits organiques de la souche SP22 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis des champignons cibles.

Aucune activité antifongique n'a été détectée avec l'extrait n-hexane de la souche SP22 contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans*. Une zone d'inhibition de l'ordre 12mm de diamètre a été obtenue avec l'extrait Acétate d'éthyle et cela contre *Candidas albicans*. En revanche, l'activité est nulle vis-à-vis d' *Aspergillus niger* avec le même solvant, par contre la plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait méthanolique contre *Aspergillus* (13 mm) de diamètre, suivie d'une zone d'inhibition de 12mm vis à vis de *Candida albicans*.

## Résultats et discussion

Pour la souche SP23, La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec l'extrait méthanolique contre *Aspergillus niger* avec une zone d'inhibition de 22mm de diamètre, hormis l'activité n'est nulle vis-à-vis de *Candida albicans*.

L'extrait n-hexane montre une activité importante et cela contre *Aspergillus niger* et *Candida albicans* avec des zones d'inhibitions de 11 et 12 mm de diamètre respectivement. Par ailleurs l'acétate d'éthyle est actif uniquement à l'égard de *Candida albicans* avec un diamètre d'inhibition de 7 mm.



**Figure 18** : Activité antifongique des extraits organiques de la souche SP23 en fonction des solvants d'extraction vis-à-vis de champignons cibles.

D'après ces résultats obtenus on constate que le méthanol qui est un solvant polaire s'est avéré être le meilleur solvant organique utilisé pour extraire les molécules bioactives et cela pour les deux souches SP22 et SP23 contre les germes *Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

Ces résultats corroborent avec ceux d'AUGUSTINE *et al.* (2005), montrant que les souches tests filamenteuses appartenant au genre *Aspergillus* sont les plus sensibles aux molécules bioactives d'actinomycètes.

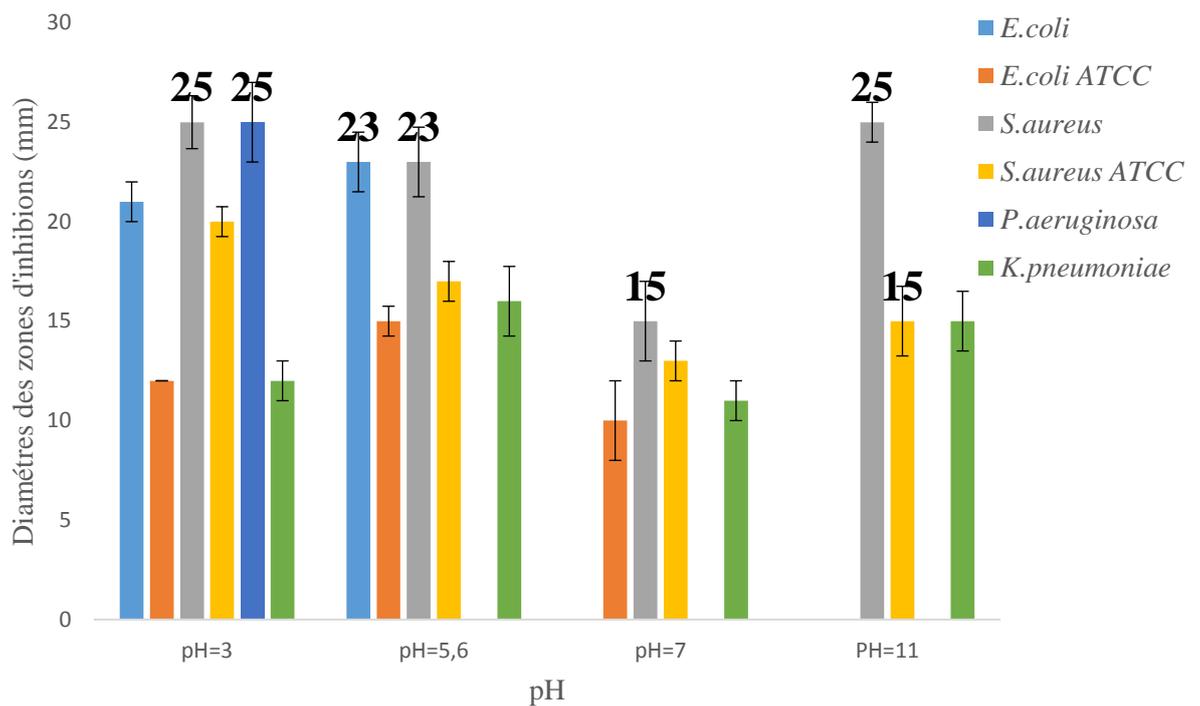
Les métabolites secondaires biologiquement actifs (antibiotiques, antifongiques) sont généralement liés et influencés par le métabolisme primaire de la bactérie productrice. Un ou plusieurs métabolites intermédiaires du métabolisme primaire servent fréquemment comme précurseur pour leur synthèse. Toutefois, la composition du milieu de culture gouverne la capacité et la quantité de métabolites secondaires produit par le micro-organisme en question. Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone ainsi que les additifs chimiques à savoir le potassium ( $K_2HPO_4$ ), le magnésium ( $MgSO_4, 7H_2O$ ) et les oligoéléments influencent énormément la capacité de production des antibiotiques chez les *Streptomyces* (MELLOULI *et al.*, 2004 ; FOURATI BEN FGUIRA, 2005 ; BEN AMEUR *et al.*, 2006).

## **VI-Etude de la stabilité des molécules produites par les actinomycètes**

### **1-Effet de la variation du pH**

La stabilité des molécules produites par les actinomycètes SP22 et SP23 à été testée en mélangeant un volume de l'extrait d'acétate d'éthylbrut avec de NaOH et de HCl pour obtenir des solutions à pH 3, 7 et 11. L'activité de ces solutions contre les germes cibles a été étudiée par la technique des disques (6mm) de papier Wathman, Les résultats obtenues sont présentés dans la figure suivante:

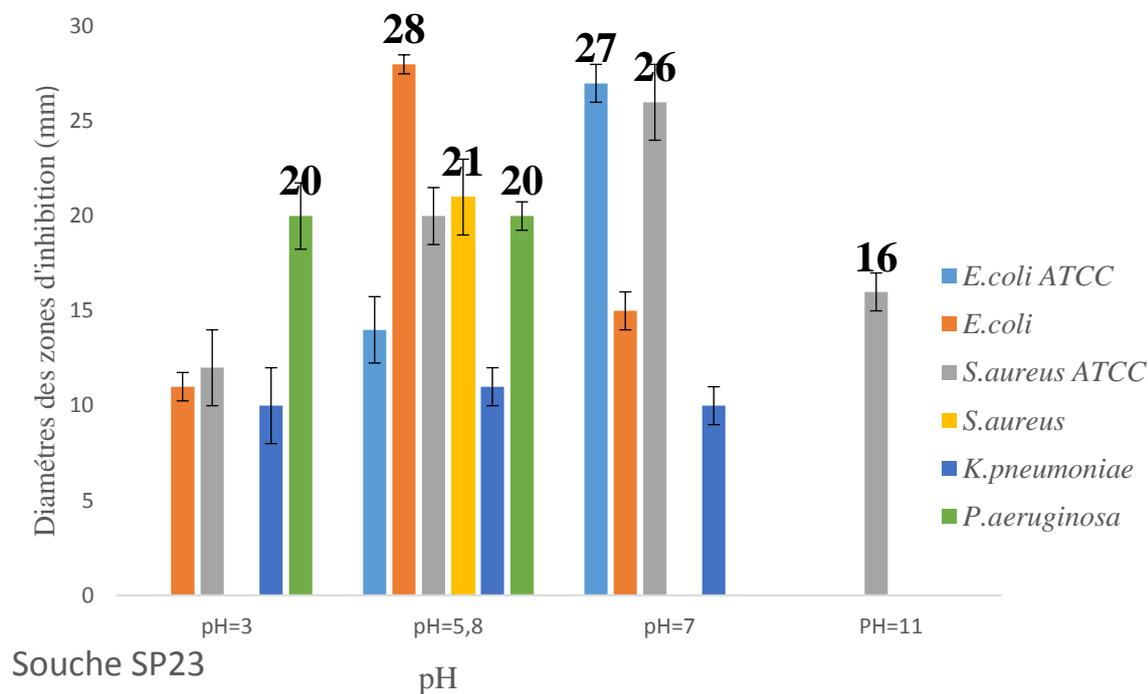
## Résultats et discussion



**Figure 19:** Activité de l'extrait acétique de la souche SP22 vis-à-vis des bactéries cibles en fonction du pH.

L'extrait d'acétate d'éthyle de la souche SP22 (pH=5,6) présente une activité importante contre toutes les souches sauf pour *P.aeruginosa*. A pH 3 l'activité antibactérienne reste stable et on observe l'apparition d'une zone d'inhibition importante contre *P. aeruginosa* (25mm). A pH neutre (pH=7) on observe la diminution des diamètres des zones d'inhibition et perte de l'activité contre *E. coli*. Par contre à pH basique (pH=11) il y a perte de l'activité contre les deux souches *E. coli* (ATCC et clinique), et *P. aeruginosa*, elle reste stable pour les trois autres souches. L'extrait d'acétate d'éthyle de la souche SP22 est plus actif dans le milieu basique, l'activité diminue avec l'augmentation de pH, l'extrait brut de pH égal 5,6 est le mieux performant.

## Résultats et discussion



**Figure 20 :** Acitivité de l'extrait acétique de la souche SP23 vis-à-vis des bactéries cibles en fonction du pH.

L'extrait brute obtenu avec l'acétate d'éthyl (pH=5,8) présente une activité antibactérienne contre tous les germes testés.

A pH acide (pH=3) l'extrait perd son activité contre *E. coli* ATCC et *S. aureus*, elle est diminuée contre *E. coli* (28mm-11mm) et *S. aureus* ATCC (20mm-11mm). Elle reste stable contre *K. pneumoniae*.

A pH=7, on remarque l'augmentation de l'activité contre les deux souches *S. aureus* ATCC (20mm-26mm) et *E. coli* ATCC (14-27mm). Par rapport au germe *K. pneumoniae*, le diamètre reste constant. L'extrait n'a plus d'activité contre *S. aureus* et *P. aeruginosa*.

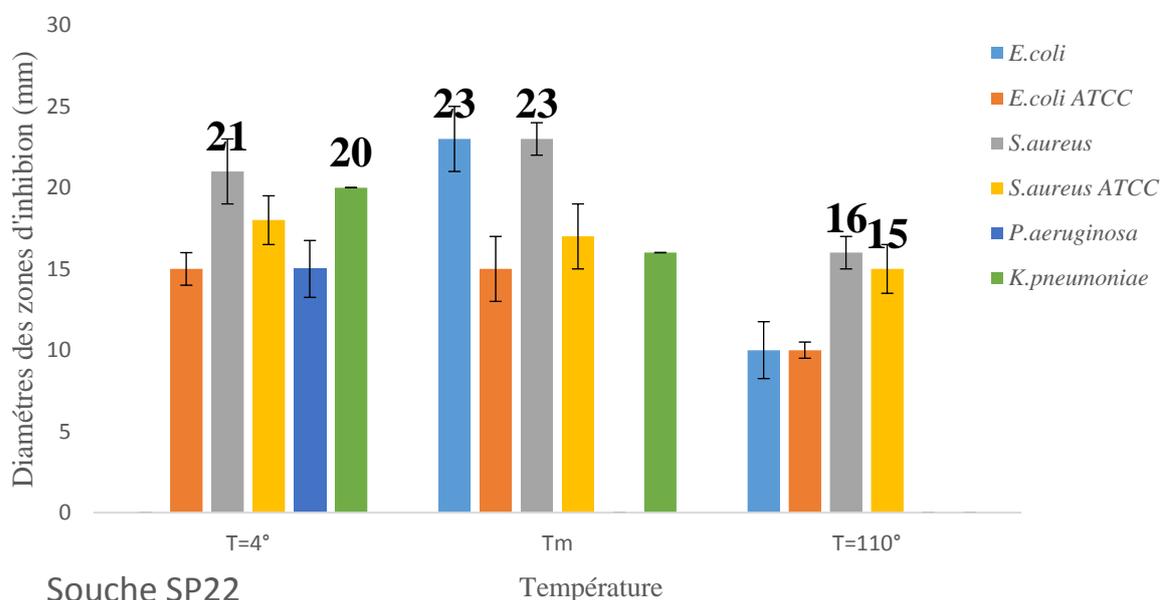
L'extrait à pH=11 n'a plus d'activité contre les bactéries tests sauf pour *S. aureus* ATCC mais elle diminue (20mm-16mm)

## Résultats et discussion

L'extrait de la souche SP23 est sensible à la variation du pH, on remarque la diminution de l'activité dans le milieu acide (pH=3) et le milieu basique (pH=11), à pH neutre l'activité de l'extrait reste stable. On note que l'extrait brut (pH=5,8) présente une meilleure performance.

### 2-Effet de la température

La connaissance de l'effet de différentes températures sur notre extrait d'Acétate d'éthyle est très importante pour la suite des expérimentations. A cet effet une palette de température est testée : 4°C, température ambiante, et 110°C. Les résultats de ce test sont illustrés dans les figures suivantes :



Tm : Extrait à température ambiante (Tm=25°C)

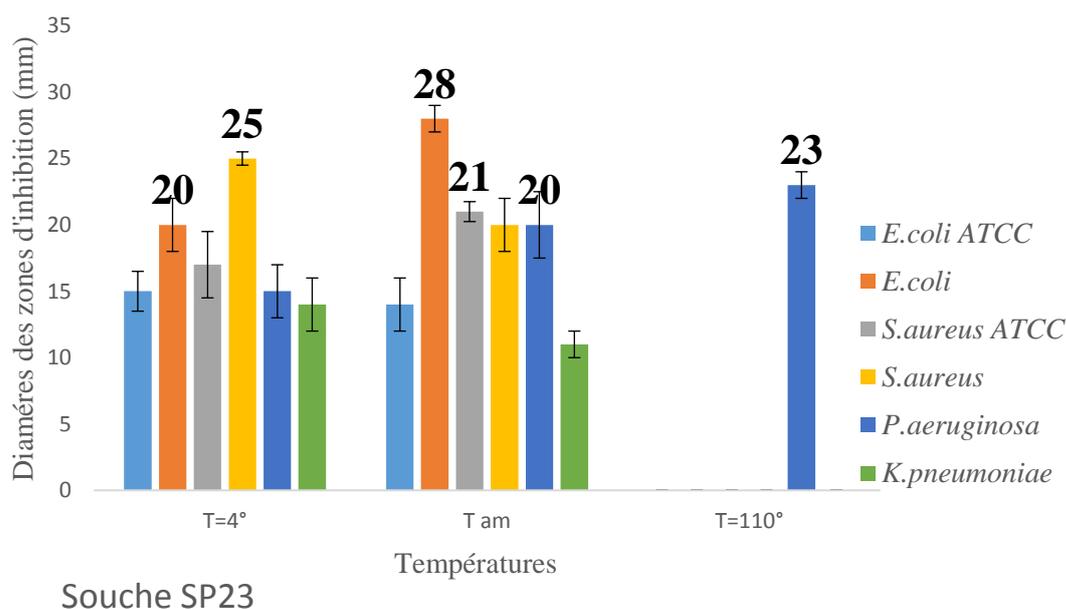
**Figure 21** : Activité de l'extrait acétique de la souche SP22 vis-à-vis des bactéries cibles en fonction de la température.

La plus grande zone d'inhibition est marquée contre *E.coli* et *S.aureus* de 23 mm de diamètre à température ambiante, en effet tous les germes cibles testés présentent une activité à cette température à l'exception de *P.aeruginosa*.

On note aussi que l'extrait d'acétate d'éthyle résiste aussi à la faible température (4°C), une zone maximale apparue contre *St aureus* avec un diamètre de 21mm, par contre il est

## Résultats et discussion

sensible vis-à-vis de *E.coli*. Les molécules antibactériennes de l'extrait d'Acétate d'éthyle actives contre *E.coli*, *E.coli* ATCC, *S.aureus* et *S.aureus* ATCC même après autoclavage à (110°C/30min) avec une grande zone marqué contre *S. aureus*(16mm) en revanche l'absence totale de développement a l'égard de *P. aeruginosa* et *K.pneumoniae*.



Tm : Extrait à température ambiante (25°C).

**Figure 22 :** Acitivité de l'extrait acétique de la souche SP23 vis-à-vis des bactéries cibles en fonction de la température.

Selon les résultats présentés dans la figure ci-dessus, l'extrait acétique montre une activité importante à l'égard de toutes les bactéries cibles à différentes températures.

On constate que la meilleure activité est obtenue à température ambiante et cela contre *E.coli* de diamètre 28mm. À 4°C aussi l'activité est remarquable vis-à-vis des germes cibles essentiellement contre *St aureus*(25mm). En revanche l'extrait acétique est sensible après autoclavage (110°C/30min) contre les germes cibles à l'exception de *P.aeruginosa* avec une zone importante de diamètre (23mm).

## Résultats et discussion

---

On peut conclure que l'extrait d'acétate d'éthyle est plus actif à températures ambiante et il garde sa stabilité à des températures basses (4°C) et cela pour les deux souches SP22 et SP23.

Les molécules antibactériennes du mycélium sont actives à des pH allant de 2 à 8. Cette activité est optimale à un pH de 4 et devient inexistante en milieu très alcalin (pH de 9 à 10) (REGHIOUA, 2008). D'autres résultats identiques ont été rapportés par plusieurs auteurs comme HILALI *et al.* (2002) et KITOUNI (2008).

Les résultats de l'activité antibactérienne des extraits actifs soumis à un traitement thermique à différentes températures et à la protéinase. Cette activité est mise en évidence, par la technique de diffusion contre *B. subtilis* 52,62. L'extrait de la souche S<sub>j</sub>38 a montré une sensibilité à la température et la protéinase K suggérant que la substance (s) bioactive (s) produite (s) serait de nature protéique. Toutefois, les extraits des souches S<sub>j</sub>32, S<sub>j</sub>33, S<sub>j</sub>68 et S<sub>j</sub>69 résistent à des températures élevées et un traitement à la protéinase K ; ce qui suggère que les principes actifs seraient de nature non protéique (JIHAN,2013).

L'acétate d'éthyle semble être le solvant le plus approprié pour extraire les molécules bioactives du surnageant. Les molécules antibactériennes extraites du mycélium par le méthanol pur résistent à différents pH (de 2 à 8) et conservent leur stabilité après 30 min de chauffage à 100°C ou même après congélation à -20°C (KITOUNI, 2008).

D'après FLOREY *et al.* (1949), un composé qui est soluble dans un solvant organique à pH acide est lui-même acide.

### VII-Production enzymatique

Le tableau suivant résume la biodiversité des souches d'actinomycètes étudiées.

**Tableau 13** : Biodiversité métabolique des souches d'actinomycètes (+ positif; – négatif).

Tests Souches	Hydrolyse de l'amidon	Hydrolyse de la caséine	Action sur le lait écrémé
SP20	+	+	Coagulation
SP22	+	-	Coagulation + peptonisation
SP23	+	+	Coagulation + peptonisation
SP24	+	-	Coagulation + peptonisation
SP27	-	-	Coagulation + peptonisation

D'après les résultats exprimés dans le tableau, il apparaît une biodiversité métabolique remarquable entre les actinomycètes. Quatre souches sur les 5 étudiées sont amylolytiques, elles sont capables de produire l'amylase qui dégrade l'amidon. La souche SP27 ne peut pas dégrader l'amidon, elle a une faible croissance sur le milieu amidon.

Les souches SP20 et SP23 hydrolysent la caséine de lait par la production de la caséine. On note une forte croissance de toutes les souches sur le milieu du lait écrémé. Deux types d'actions peuvent être induits sur les tubes de lait écréméensemencés avec les souches d'actinomycètes et incubés pendant 14 jours qui sont la coagulation des protéines du lait écrémé et peptonisation qui est la transformation de l'albumine en peptone.

Les souches induites SP22, SP23, SP24, et SP27 la coagulation et la peptonisation du lait écrémé par contre la souche SP20 n'induit que la coagulation et pas la peptonisation.

Huit souches sur neuf d'actinomycètes étudiées par BELYAGOUBI (2014) amylolytiques, 7 d'entre elles sont capables d'hydrolyser la caséine, 5 peuvent induire la

## Résultats et discussion

---

coagulation du lait écrémé et 4 souches induits la peptonisation par contre aucune des souches n'est capable d'induire la coagulation et la peptonisation.

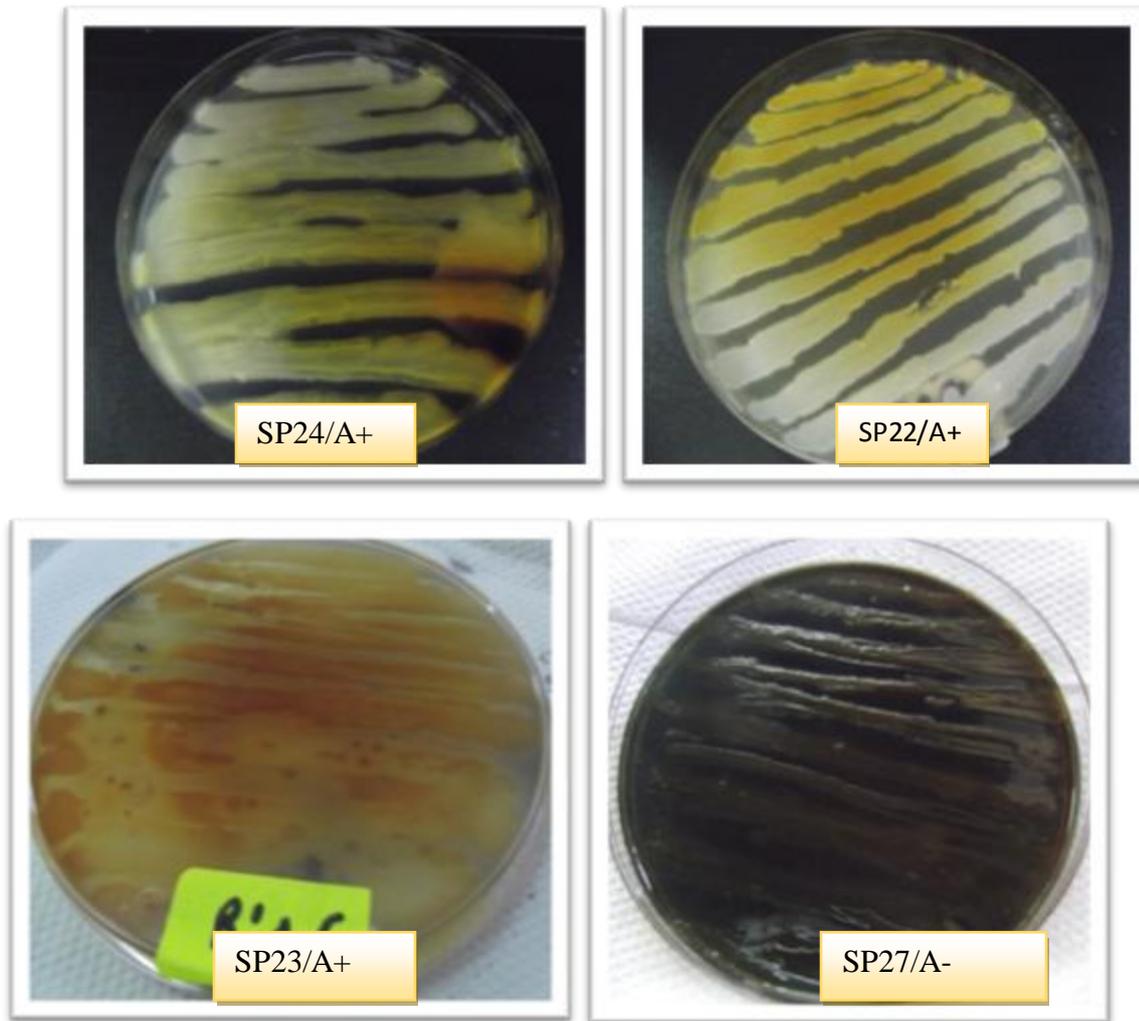
Parmi les 10 souches étudiées par HOUDA MORAKCHI (2011) ,7hydrolysent l'amidon et 2 souches seulement hydrolysent la caséine.

Les isolats exhibent également de nombreuses activités enzymatiques telles que l'hydrolyse de l'hydrogène sulfuré, de la gélatine, de l'amidon ainsi que la lécithine. Ces substrats sont dégradés par certaines espèces de *Streptomyces* pour être utilisé comme source de carbone (SCHATZ *et al.*, 1956 ; ADELSON *et al.*, 1957) mais également pour la production d'antibiotiques (BROCK, 1956).

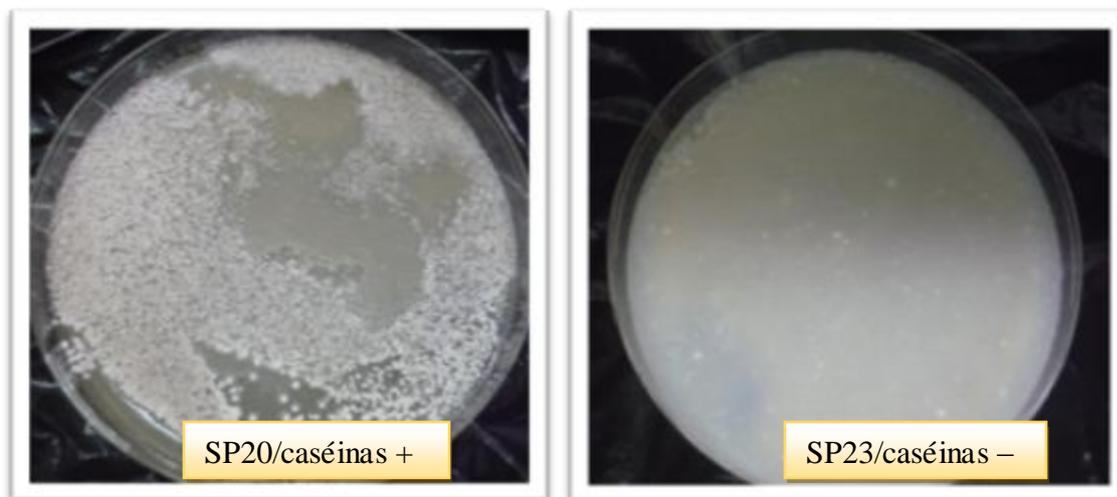
La majorité de ces souches sont capables de métaboliser l'amidon et la caséine du lait, pour assurer la source de carbone et d'azote (BELYAGOUBI ,2014)



**Figure24:** Résultats de l'action des souches d'actinomycètes étudiées sur le lait écrémé.  
(R'13=SP20, R'15=SP22, R'16=SP23,R'17=SP24,R'20=SP27,T=témo in négatif)



**Figure 25:**Hydrolyse de l'amidon par les différentes souches d'actinomycètes. (A+=Hydrolyse, A-= Absence de l'hydrolyse).



**Figure 26:**Résultats de la dégradation de la caséine par les souches SP20 et SP23. (Dégradation(+), absence de dégradation(-)).

### VIII-Galerie biochimique

Les résultats des différents tests biochimiques réalisés sur les deux souches SP22 et SP23 sont illustrés dans le tableau15 et, quelques figures des résultats obtenus sont indiquées dans l'annexe 8.

**Tableau14 :** Tableau synthétique de quelques caractères biochimiques des deux souches cibles.

Souches Caractères	SP22	SP23
Voie d'attaque des glucides	Oxydatif	Oxydatif
Catalase (MEVAGE)		
Catalase	+	+
B-galactosidase(ONPG)	-	-
Oxydase	-	-
Nitrate réductase	+	+
Mobilité	+	-
Mannitol	+	+
Citrate	+	+
Glucose	+	+
Saccharose et/ou lactose	+	+
H <sub>2</sub> S	-	+
Gaz	+	-
RM	+	+
VP	-	-
Indole	+	+

+ : Résultat positif, – : résultat négatif.

### **a-Recherche de la $\beta$ -galactosidase et l'oxydase**

Après préparation des suspensions et ajout des disques ONPG pour la recherche de la  $\beta$ -galactosidase et des disques d'oxydase, nous ne constatons aucun virage de couleurs et cela pour les deux souches SP22 et SP23, elles sont donc ONPG négative et oxydase négative.

### **b-Recherche de la catalase**

L'apparition d'un bouillonnement accompagné d'un dégagement du gaz (l'effervescence) sur les deux souches testées après contact de ses dernières avec de l'eau oxygénée; elle sont donc catalase positives.

### **c-Recherche de la Nitrate réductase**

Des tubes contenant de bouillon nutritif de nitrate et de potassium sontensemencés, puis incubés à 28°C, après 7 jours d'incubation, l'ajout de 3 gouttes des réactifs NRI et NR II aux suspensions microbiennes n'engendre aucune réaction particulière ; le milieu ne contient pas de nitrite ; et cela peut être expliqué soit par la transformation de Nitrite en diazote, soit la souche microbienne ne possède pas de Nitrate réductase. Nous y ajoutons la poudre de zinc cette dernière a la capacité de réduire les nitrates en nitrites, de même aucune réaction n'est marquée ce qui explique que les réactifs ajoutés au paravent ne présentent aucun effet sur les nitrites. Les bactéries ont transformée les nitrates en nitrites puis la dénitrification a permis l'obtention de diazote, donc nos deux souches SP22 et SP 23 possèdent donc une Nitrates réductase.

### **d-Etudes de la fermentation des sucres(Glucose, Lactose, Saccharose)**

Après incubation à 28°C pendant 7 jours, une réacalinsation du milieu, se traduisant par une couleur rouge et cela pour tous les tubesensemencés des souche SP22 et SP23, ses dernières fermentent donc le Glucose. En plus les tubes contenant les deux souches virent vers le jaune ; celle-ci fermentent donc le Saccharose et/ ou le Lactose.

## Résultats et discussion

---

On constate aussi la présence d'une coloration noire et absence de bulles ou de fragmentation de la gélose dans le tube ensemencé de la souche SP23, celle-ci est donc H<sub>2</sub>S+, Gaz-. Par ailleurs le tube contenant la souche SP22 ne présente pas la coloration noire mais on remarque la présence de bulles, celle-ci est donc H<sub>2</sub>S-, Gaz+.

### e- Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Après incubation à 28°C pendant 7 jours, les tubes du milieu Citrate de Simmons, ensemencés des deux souches SP22 et SP23 virent vers le bleu, ces dernières fermentent donc le citrate.

### f- Caractères mannitol et mobilité

Après 7 jours d'incubation à 28°C, on constate un changement de couleur vers le jaune dans tous les tubes, en effet la fermentation du fructose conduit à la formation de mannitol qui est lui-même dégradé en acide à courtes chaînes induisant ainsi une acidification du milieu ce qui explique le virage de couleur au jaune. En ce qui concerne la mobilité les tubes contenant la souche SP22 montrent la présence d'un trouble homogène celle-ci donc est mobile, par contre la souche SP23 est immobile.

### g- Détermination de la voie d'attaque des glucides

Après 7 jours d'incubation à 28°C, les tubes additionnés ou non de vaseline, ensemencés des souches testées ont donné les résultats suivants :

Les tubes ensemencés des deux souches SP22 et SP23 non recouverts de vaseline virent vers le jaune; les tubes additionnés de vaseline pour les deux souches restent rouges (pas de virage de couleur). Les souches SP22 et SP23 possèdent donc un métabolisme oxydatif.

### h-caractères RM et VP

Les réactions de RM sont positives dans tous les tubes contenant le milieu Clarke et Lub probablementensemencés des bactéries testées. En revanche les réactions de VP sont négatives et cela pour les deux souches SP22 et SP 23.

### i-Production d'indole

Après incubation à 28°C pendant 7jours, les tubes contenant le milieu EPEensemencés des souches testées, le réactif de Kovacs a été additionné afin de mettre en évidence la présence de l'indole, en effet l'apparition d'un anneau rouge au niveau des tubes probablementensemencés des souches SP22 et SP23 ; celle-ci produisent donc de l'indole.

### IX-Tests de sensibilité aux antibiotiques

**Tableau15:** Résultats des tests de sensibilité des souches SP22 et SP23 vis-à-vis de quelques antibiotiques.(S :sensible ; R :résistant).

<b>Antibiotiques</b> <b>Souches</b>	<b>Kanamycine</b>	<b>Amoxylline</b>	<b>Cefoxitine</b>	<b>Pénicilline</b>
<b>SP22</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>
<b>SP23</b>	<b>S</b>	<b>R</b>	<b>R</b>	<b>R</b>

D'après les résultats ci-dessous on constat que nous souches SP22 et SP23 résistent antibiotiques tests hormis la Kanamycine qui s'est avéré sensible à l'égard de la souche SP23.

Tous les isolats étudiés par AOUAR (2012) sont résistants à la pénicilline, la fosfomycine, l'oxacilline et l'acide nalidixique. Cependant, elles sont toutes sensibles au chloramphenicol, à la gentamycine, pristinamycine, kanamycine et la tetracycline.

## Résultats et discussion

---

En dépit du nombre conséquent de tests effectués (20 tests), il est impossible d'attribuer ces souches à des espèces actinomycétales types sans le recours à la taxonomie numérique et à l'application de tests statistiques (ZITOUNI, 2005).

Il est par conséquent impossible d'affilier avec certitude ces souches. Cependant, ces tests restent intéressants par le fait qu'ils indiquent certaines caractéristiques physiologiques importantes pouvant être utiles pour la sélection de ses souches tel que la résistance des 2 souches à au moins 2 antibiotiques parmi ceux utilisés.

La résistance des souches à certains antibiotiques sous-entend leur aptitude à la production de ces molécules. Vraisemblablement, tant qu'une souche est sensible à ses propres antibiotiques dans une certaine mesure, elle est encore plus sensible aux autres substances antibiotiques (BOUCHEFFA, 2011). Selon NOUVEL (2005) l'utilisation d'un antibiotique inhibe les bactéries sensibles à cet antibiotique mais permet la multiplication des autres résistantes.

L'identification des actinomycètes repose principalement sur l'étude de plusieurs caractères morphologiques, biochimiques et physiologiques, mais vue que ces méthodes sont lentes, laborieuses et très coûteuses, elles ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leur rapidité et efficacité (KIM *et al.*, 1999, LABEDA et KROPPENSTEDT, 2000, COOK *et al.*, 2003). Parmi les méthodologies employées, la PCR est largement pratiquée.

## Conclusion générale

---

Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que :

Les observations macroscopique et microscopique nous laissent conclure que nos souches cibles sont probablement des actinomycètes.

L'activité antibactérienne des cinq souches d'actinomycètes a été testée sur six bactéries (*E.coli* , *E.coli* ATCC, *P.aeruginosa*, *S.aureus*, *S.aureus* ATCC et *K.pneumoniae*) et deux types de champignons (*C.albicans* et *A.niger*). Les cinq souches d'actinomycètes étudiées sont actives envers au moins une bactérie et un champignon cible et cela après criblage de ses souches sur milieu solide, La souche SP22 possède une activité très importante et cela contre toutes les bactéries cibles avec des zones d'inhibition les plus importantes de diamètre de 50 et 46mm contre *Staphylocoque* et *P. aeruginosa* respectivement. Les résultats obtenus vis-à-vis des champignons cibles révèlent aussi des zones d'inhibition importantes avec les souches SP23 et SP22 contre *Aspergillus niger* (36mm) et *Candida albicans* (27mm) respectivement. Les deux souches d'actinomycètes SP22 et SP23 sont sélectionnées pour la suite du travail comme les souches les plus productrices d'antibactériens.

La cinétique de croissance et de production nous a permis de connaître le meilleur jour de croissance et de production des antibiotiques en effet, les résultats d'étude montrent que la cinétique de croissance et de production d'antibiotiques est maximale au quatrième et sixième jour d'incubation respectivement.

L'extraction par une batterie de solvants organiques de polarité différente nous a permis de choisir le meilleur solvant organique. Le test d'activité des extraits organiques indique que l'acétate d'éthyle serait le meilleur extracteur de ces activités car il permet d'exprimer les meilleurs spectres d'action à l'égard des germes cibles testés.

L'étude de la stabilité des molécules produites par les actinomycètes SP22 et SP23 a été testée en mélangeant un volume de l'extrait d'acétate d'éthyle brut avec de NaOH et de HCl pour obtenir des solutions à pH 3, 7 et 11. Ainsi qu'un test de stabilité de ses molécules vis-à-vis des différentes températures (4°C , Tm et 100°C) sur notre extrait d'Acétate d'éthyle a été réalisé. Les résultats obtenus montrent que l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche SP22

## Conclusion générale

---

est stable vis-à-vis des paramètres ( pH, T°), en revanche l'extrait de la souche SP23 est affecté par ces paramètres.

L'intérêt de ce métabolite dans le domaine médicale et de la santé publique nécessite son étude d'une manière plus approfondie en procédant à :

- L'identification moléculaires des souches(16s RNA).
- L'identification des molécules ainsi produites.
- L'optimisation de la production en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources de carbone et azotées, élément minéraux, température, aération et pH).
- La purification complète des molécules produites (en utilisant d'autres techniques chromatographiques comme l'HPLC).
- Déterminer leurs structures par l'utilisation de plusieurs techniques spécifiques tel que la spectroscopie d'absorption en lumière IR, la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices ( CMI).

## Références bibliographiques

---

- **ABRAHAM E-P., CHAIN E. (1940).**An enzyme from bacteria able to destroy penicillin.
- **ALEXANDER M. (1977).** Introduction to soil Microbiology. Krieger Publishing Company, Malabar: 467-468.
- **ALVES-SANTOS F.M., CORDEIRO-RODRIGUES L., SAYAGUÉS J-M., MARTIN-DOMNIGUEZ R., GARCIA-BENAVIDES P., CRESPO M-C., DIAZ-MINGUEZ J.M., ESLAVA A-P. (2002).** Pathogenicity and race characterization of *Fusarium oxysporum* f. sp. *phaseoli* isolates from Spain and Greece. *Plant Pathol.* 51, 605-611.
- **AMEUR. H.,GHOUL M. (2012).** Screening of Actinomycetes Producing Antibacterial Substances and Indole Acetic Acid (IAA) and Optimization of Growth and IAA Production Conditions in *Streptomyces* sp. SF5. *International Journal of Pharmaceutical & Biological Archives.* Vol 3(3). Pp :545-551.
- **ANDERSON A-S., W ELLINGTON E-M-H. (2001).** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.* 51: 797–814.
- **AOUR L. (2000).** Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Diplôme de Magister,*Université Mentouri Constantine*: 101p.
- **AQUES B.(2004).** Le technicien d'analyse biologique. 2eEdition, Paris : 1201p.
- **AUGUSTINE S-K., BHAVSAR S-P., KAPADNIS B. (2005).** A non-polyene antifungal antibiotic from *Streptomyces albidoflavus* PU 23.*Journal of Bioscience and Biotechnology* 30(2): 201-211.
- **BADJI B., RIBA A., MATHIEU F.,LEBRIHI. A., SABAOU N. (2005).**Activité antifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale.* Vol 15. Pp : 211–219.
- **BADJI. B., ZITOUNI. A., MATHIEU. F., LEBRIHI. A., SABAOU S. (2006).** Antimicrobial compound produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Canadian Journal of Microbiology* 52, 373–382.

## Références bibliographiques

---

- **BAKER K-F., COOK J-R. (1 974).** Biological control of plant pathogens. W. H. Freeman and Company, San Francisco.
- **BASTIDE A., DE MEO M., ANDRIANTSOA M., LAGET M., DUMENIL G. (1986).** Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *MIRCEN journal of applied microbiology and biotechnology* ., 2, 453-466.
- **BECKERS.H. J.-A., VAN DER HOEVEN. J-S. (1982).** Growth Rates of *Actinomyces viscosus* and *Streptococcus mutans* During Early Colonization of Tooth Surfaces in Gnotobiotic Rats. *Infection and immunity*. Vol. 35. N°. 2. Pp: 583-587.
- **BECKING J-H. (1974).** Family III .*FRANKIACEAE*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th ed. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds) Williams and Wilkins Co. Baltimore., pp 701-706.
- **BEGEU P., ASTRUC J. (1999).** Pathologie infectieuse de l'enfant, Masson page 612.
- **BEN AMEUR R., SIOUD S., BEN FGUIRA L., BEJAR S., MELLOULI L. (2006).** Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Process Biochemistry*. (2006) 41: 1506-1513.
- **BEN FGUIRA L., FOTSO S., BEN AMEUR R., MELLOULI L., LAATSCH H. (2005).** Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. US80 strain. *Research in Microbiology*. 156: 341-347.
- **BEN YAOU A. (2015).** Isolement de souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives. Mémoire du master microbiologie appliquée université MOULOUD MAMMERI TIZI OUZOU
- **BENZEGGOUTA N. (2005).** Etude de l'activité antibactérienne des huiles infusées de Bruxelles : 805-825.
- **BÉRDY J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *The Journal of Antibiotics*. 58(1): 1-26.
- **BERDY J., AAZALOS A., MC NITT K-L., (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.

## Références bibliographiques

---

- **BOIRON P., PROVOST F., DUPONT B. (1993).** Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur, Collection "Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur", Paris. 180 p.
- **BORAMORA A., ATTILI A., ARENGHI F. (2007).** A novel chimera : "the truncated hemoglobin-antibiotic monooxygenase" from *Streptomyces avermitilis*. *Gene*, 393 : 52-61.
- **BOUDEMAGH. (2007).** Thèse de Doctorat Etat En Microbiologie Appliquée, Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Université Mentouri Constantine Faculté des Sciences Département des Sciences de la Nature et de la Vie, 2007
- **BOUDJELLA H., BOUTIA K., ZITOUNIA A., MATHIEUB F., LEBRIHIB A., SABAOUA N. (2006).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 161(4) : 288–298.
- **BOUGHACHICHE F., REGHIOUA S., OULMI L., ZERIZER H., KITOUNI M. et, BOUDEMAGH A., BOULAHROUF A. (2005).** Isolement d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia de AIN MLILA. *Sciences & Technologie C N°23*, juin (2005), pp. 5-10.
- **BOUSSABER (2012).** Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antibactériennes .
- **BUCHANAN R-E., GIBBONS N-E. (1974).** *BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY.*, 8th Edition (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore., 1 268 p.
- **BU'LOCK J-D. (1975).** Secondary metabolite in fungi and its relationship to growth and development. In: *The Filamentous Fungi.* (Smith, J.E. and Berry, R.D. Eds). Wiley and Soc. Lnc. Vol 1 : 35-3 8.
- **CADET D-E., FONTENAY G., LAVEILLE B., LINAS M-D., SEGULA, J-P. (1996).** Comparaison statistique de deux méthodes d'évaluation de l'activité antifongique., *Journal de Mycologie Médicale* 6 (3) : 129–132.
- **CANU A. et LECLERQ R. (2001).** Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition.

## Références bibliographiques

---

- **CARELOTTI A., BOIRON P., PROVOST P., VILLARD J. (1994).** Nocardia et bactéries apparentées. In : Manuel de Bactériologie clinique. Eds : Freney, J., Renaud, F., Hansen, W., and Bollet C. 2<sup>ème</sup>Éd. 2: 811–831.
- **CARLE S., PHARM B. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. Pharmactuel. 36: 25-41. Carthage : 12p
- **CAVALLO J-D., FABRE R., JEHLF., RAPP C., GARRABÉ E. (2004).** Betalactamantibiotics. EMC-Maladies Infectieuses: 1, 129–202.
- **CHAIN, E., FLOREY H-W., HARDNER A-D., HEATLEY N-G., JENNINGS M-A., ORR-EWING J., SANDERS A-J. (1940).** "Penicillin as a Chemotherapeutic Agent." Lancet 239: 226-228. Constantine
- **CHIBA H., AGEMATU H., KANETO R., TERASAWA T., SAKAI K., DOBACHI K., YOSHIOKA T. (1999).** Rhodopeptins (Mer-N1033), novel cyclic tetrapeptides with antifungal activity from Rhodococcus sp.: I. taxonomy, fermentation, isolation, physic-chemical properties and biological activities. J Antibiotics, 52(8):695-699.
- **COLLINS M-D., JONES D. ( 1981).** Distribution of isoprenoidquinone structural types degrading actinomycetes. Systematic and Applied Microbiology. 27:61-5.
- **COOK A-E., MEYERS R. (2003).** Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. (2003) 53:1907-15.
- **COURVALIN P., DENIS F., PLOY M-C, GARILHE M-P-D., TRIEU-CULOT P. (2001).** Universalis. "Antibiotiques." Retrieved 24 mai, 2013, from <http://www.universalis-edu.com/encyclopedie/antibiotiques/>. dans : Kirst H. et Shonfeld W. Macrolides. Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin: 37-52.
- **COURVALIN P., PHILIPPON A. (1990).** Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. In : Bactériologie médicale. Médecine- Sciences. Flammarion. France. Ch14 : 332-355.
- **CWALA Z., IGBINOSA E-O., OKOH A-I. (2011).** Assessment of antibiotics production potentials in four actinomycetes isolated from aquatic environments of the Eastern Cape Province of South Africa. African Journal of Pharmacy and Pharmacology. Vol. 5. N°: 2. Pp118-124.

## Références bibliographiques

---

- **DAVIES F-L., WILLIAMS S-T. (1970).** Studies on the ecology of actinomycetes in soil: I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 2(4): 239–246.
- **DEMAIN A-L. (1989).** Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. *In: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes.* Shapiro, S., editor Boca Raton, FL: CRC Press. 127-134.
- **DEMAIN A-L., SOLOMON N-A. (1985).** *Biology of industrial microorganisms.* Edition: The Benjamin/ Commings Publishing Company, London, p. 291–357.
- **DEMAIN A-L., LANCINI G. (2006).** - Bacterial Pharmaceutical Products in Prokaryotes, 1, 812–833.
- **DENIZCI A-A. (1996).** Study on the detection and production of antibacterial antibiotics from actinomycetes which isolated from the soils of Aegean Eastern black sea regions of Turkey. Ph D. Thesis. Ege University. Institute of Science. Izmir.  
Desubstancesantifongiques. Science Lib Editions Mersenne: Volume4, N°120801
- **DGIGAL D. (2003).** Interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale.
- **DIVYA TEJA, D., HARSHA N., SATYA V., LAKSHMI S. (2014).** Production of L-glutaminase from marine ecosystems and optimal conditions for maximal production by actinomycetes *International Journal of Advanced Research* 2 (1): 485-491.
- **DOMMERGUES Y., MANGENOT F. (1970).** *Ecologie microbienne du sol.* Masson et Cie, Ed., Paris.
- **DOULL J-I., VINING L-E. (1990).** Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Applied Microbiology and Biotechnology* Vol 32 : 449-454.
- **DREW S-X., DEMAIN A-L. (1977).** Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annual Review of Microbiology* . Vol 31 : 343-356
- **DUANGMAL K., WARD A-C., GOODFELLOW M., (2005).** Selective isolation of members of the *Streptomyces violaceoruber* clade from soil. *FEMS Microbiology Letters*. 245: 321-327.

## Références bibliographiques

---

- **DUCHESNE E. (1897).** Contribution à l'étude de la concurrence vitale chez les microorganismes ; antagonisme entre les moisissures et les microbes. Faculté de Médecine et de Pharmacie de Lyon. France. thèse de doctorat: 64 pages.
- epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews*.7 (3): 357–417.
- **EUNICE J- A., PROSSER J- I. (1983).** Mycelial growth and branching of
- **FORSBERG K-J., REYES A., WANG B., SELLECK E-M., SOMMER M-O-A., DANTAS G. (2012).** The shared antibiotic resistome of soil bacteria and human pathogens. *Science*, 337: 1107–1111.
- **FUKUNAGAK K., MISATOT T., ASAKAWA M., BLASTICIDIN. (2008).** A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance.Part I. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*. 19: 181-188.
- **GARRITY, G.M., BELL, J.A., LILHURN, T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the Procaryotes, *Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology*. Second Edition Release 5.0, SpringerVerlag, *New York*. 1-399. [http:// dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310](http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline200310).
- **GENNE D., SIEGRIST H., (2003).** De l'antibiogramme à la prescription d'un antibiotique. *Forum Med Suisse*. 20; 464-468.
- **GOODFELLOW M., JONES A-L., MALDONADO L-A., SALANITRO J. (2004).**
- **GOODFELLOW M. et WILLIAMS S-T. (1983).** Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*. Vol: 37. Pp: 189-216.
- **GORDON R-E., SMITH M-M. (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.*, 66, 41-48.
- **GOTTLIEB D. (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales. In : *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Edited by G. Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London, New York.
- **GUERNET M., HAMON M. (1981).** Abrégé de chimie analytique (tome 1). Masson Edition Paris : 8-12.
- **GUIRAUD J-P. (2007).** Microbiologie alimentaire. Dunod. France. Partie / B : 79-168.
- **GUNGI S., ARIMA K., BEPPY T. (1983).** Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry*. 47: 2061-2069.

## Références bibliographiques

---

- **GUPTA R-C., TANDON R-N. (1977).** Growth inhibition of fungi by volatiles from streptomycetes. *Trans. Br. Mycol. Soc* 68 :438-439.
- **GURUNG T-D., SHERPA C., AGRAWAL V-P., LEKHAK B. (2009).** Isolation and Characterization of Antibacterial Actinomycetes from Soil Samples of Kalapatthar, Mount Everest Region. *Nepal Journal of Science and Technology*. Vol 10. Pp:173-182.
- **HACENE H., SABAOU N., BOUNAGA N., LEFEVRE G. (1994).** Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare actinomycetales. *Microbios*, 79(319):81–5.
- **HASEGAWA S., MEGURO A., SHIMIZU M., NISHIMURA T., KUNOH H. (2006).** Endophytic actinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetol.* 20 (2): 72-81.
- **HAYAKAWA M., YOSHIDA Y., LIMURA Y. (2004).** Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces violaceusniger* phenotypic cluster. *J. Appl. Microbiol.* 1-9.
- **HAZEN E-L., BROWN R. (1951).** Fungicidin, an antibiotic produced by soil actinomycete. *Proc SocExp Bio Med*, 76(1): 93–97.
- **HELL M-E. (1993).** A method for increasing the success rate of duplicating antibiotic activity in agar and liquid cultures of *Streptomyces* isolates in new antibiotics screens. *Journal of Fermentation Bioengineering*. Vol: 76. N°: 2. Pp: 89-93.
- **HERMAN T. (2005).** Drug targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol.* 15(3): 355-366.
- **HILALI L., KHATABI A., NSARLAH N., MALKI A., FINANCE C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 2 : 49-53
- **HODGSON D-A. (2000).** Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Phys.* Vol42 : 47-238.
- **HU Y., PHELAU V., NTAI I. (2007).** Benzodiazepine biosynthesis in *Streptomyces reuiniensis*. *Chemistry et biology*. 14 : 691-701.
- **HWANG B-K., LIM S-W., KIM B-S., LEE J-Y., MOON S-S. (2001).** Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium

## Références bibliographiques

---

Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. 67: 3739-3745.

- **INOUE O., NETTO W-S., PADILLA G., FACCIOTTI M-C-R. (2007).** Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38:58-61.
- **ISHIZAWA S., ARARAGI M. (1976).** Composition of actinomycete population in soil. In: *Actinomycetes, the boundary microorganisms*. Arai T. (Ed.) toppan Co-Ltd, Tokyo., pp 97-107.
- **IWAI Y., AWAYA J., KESADO T., YAMADA H., OMURA S., HAT T (1982).** Selective fermentation of cerulenin by *Cephalosporin caeruleus*. *J. Ferment. Technol.* (1982) 51 :575-578.
- **JAQUES B. (2004).** Le technicien d'analyse biologique. 2eEdition, Paris : 1201p
- **JIHANI S. (2013).** Isolement et identification moléculaire de souches d'actinomycètes productrices de substances antimicrobiennes à partir de biotopes marocains et caractérisation partielle des principes actifs. L'université sidi Mohamed ben Abdellah de Fès et l'université Montpellier 1.
- **JIN NEZ J-T., STURDIKOVA M., et STURDIK E. (2009).** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca*. 2: 63-74.
- **KANG M-J., STRAP J-L., CRAWFORD D-L. (2010).** Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(1): 35–41.
- **KATTERE T., ANDOREN O. (2001).** The ICBM of analytically solved models of soil carbon, nitrogen and microbial biomass dynamics — descriptions and application examples. *Ecol Model*, 136(2-3): 191–207.
- **KAUFFMAN C-A., CARVER R-L. (1997).** Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developments. *Drugs*, 53(4): 539–549.
- **KHAOUA S., LEBRIHI A., LAAKEL M., SCHNEIDER F., GERMAIN P., LEFEBVRE G. (1992).** Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Vol 36 : 763-767.

## Références bibliographiques

---

- **KHATTABI A., NSSARLAH N., MALKI, A., FINANCE C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Biotechnology and Molecular Biology Reviews* 2(1): 49–53.
- **KIESER T., BIBB M-J., BUTTNER M-J., CHATER K-F., HOPWOOD D-A. (2005)**
- **KIM., BJ., KIM C-J., CHUN J., KOH Y-H., LEE S-H., HYUN J-W., CHA C-Y., KOOK Y-H. (2004).** Phylogenetic analysis of the genera *Streptomyces* and *Kitasatospora* based on partial RNA polymerase b-subunit gene (*rpoB*) sequences. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology* 54 (2004) 593–598.
- **KITOUNI M., BOUDEMAGH A., OULMI L., REGHIOUA, S., BOUGHACHICHE F., ZERIZER, H., HAMDIKEN H., COUBLE A., MOUNIEE D., BOULAHROUF A., BOIRON P. (2005).** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *J Med Mycol*, 15(1) : 45–51.4
- **KITOUNI M (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **170p**
- **KUSTER E. (1976).** Chromogenecity of actinomycetes. In: *Actinomycetes, the Boundary microorganisms*. Arai T. (Ed.), Toppan Co. Ltd, Tokyo., pp 43- 54
- **LABEDA D-P., KROPPENSTEDT R-M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for *Actinosynnemataceae* fam. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*. 50: 331-336.
- **LABRO M. (2002).** Cellular accumulation of macrolide antibiotics. *Intracellular bioactivity*,
- **LAMARI L., ZITOUNI A. (2002).** New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *The Journal of Antibiotics*. 55:696-701.
- **LARPENT J-P., SANGLIER J-J. (1989).** *Biotechnologie des antibiotiques*. Ed. Masson, Paris. 481.

## Références bibliographiques

---

- **LECHEVALIER., LECHEVALIER, H. (1985).** Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. pp 315–360.
- **LEMRISS S., LAURENT F., COUBLE A., CASOL, E., LANCELIN J-M., SAINTPIERRE-BONACCIO D., RIFAI S., FASSOUANE A., BOIRON P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Canadian Journal of Microbiology*, 49(11): 669–674.
- **LILIEY G., CLARK A-E., LAWRENCE G-C. (1981).** Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*. Vol 31 : 127- 134.
- **LIU S., LIU S-Y., LU Z-X. (2007).** Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese Journal of Biotechnology*. 23: 1077-1081
- **LOQMAN. S. (2009).** Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse doc : Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. Pp: 253.
- **LOUCIF K. (2011 ).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine : 21p.
- **LOUNÈS A., LEBRIHI A., BENSLIMANE C., LEFEBVRE G., GERMAIN P (1995).** Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can. J. Microbiol.* (1995b) 41: 800-808.
- **MACAGNAN, D., R. DA S. ROMEIRO, A. W.V POMELLA. (2008).** Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of *Moniliophthora (ex Crinipellis) pernicioso* by phylloplane actinomycetes. *Biological Control*. 47: 309-314.
- **MAGIORAKOS A-P., SRINIVASAN A., CAREY R-B., CARMELI Y., FALAGAS M-E., GISKE C-G., HARBARTH S., HINDLER J-F., KAHLMETER G., OLSSON-LILJEQUIST B., PATERSON D-L., RICE L-B., STELLING J., STRUELENS M-J., VATOPOULOS A., WEBER J-T., MONNET D-L. (2012).** Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria:

## Références bibliographiques

---

an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical Microbiology and Infection*. 18: 268–281.

- **MARIAT F., SEBALD M.(1990)**. Actinomycétales..In:Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale.Medecine-Sciences.Flammation.France. Deuxième partie : 933-999.
- **MCKENZIE N-L., THAKER M., KOTEVA K., HUGHES D-W., WRIGHT G., NODWELL.J-N. (2010)**. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA*. *The Journal of Antibiotics*. Pp: 1– 6
- **MCKENZIE N-L., THAKER M., KOTEVA K., HUGHES D-W., WRIGHT G-D., NODWELL.J-N. (2010)**. Induction of antimicrobial activities in heterologous streptomycetes using alleles of the *Streptomyces coelicolor* gene *absA*. *The Journal of Antibiotics*. Pp: 1– 6
- **MCNEIL M-M., BROWN J-M. (1994)**. The medically important aerobic actinomycetes: Epidemiology and microbiology. *Clinical Microbiology Reviews* 7 (3): 357–417.
- **MEHLING A., WEHMEIER U-F., PIEPERSBERG W. (1995)**. Application of random amplified polymorphic DNA (RAPD) assays in identifying conserved regions of actinomycete genomes. *FEMS Microbiology Letters*. 128: 119–126.
- **MEKLAT A., SABAOU N., ZITOUNI A., MATHIEU F., LEBRIHI A. (2011)**. Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. *Applied and Environmental Microbiology* 77(18) : 6710–6714.
- **MELLOULI L., KARRAY-REBAI I., SIOUD S., BEN AMEUR-MEHDI R., NAILI B.,BEJAR S. (2004)**. Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology* . Vol 49(6) : 400-406.
- **MENDES T-D., BORGES W-S., RODRIGUES A., SOLOMON S-E., VIEIRA P-C., DUARTE M-C., PAGNOCCA, F-C. (2013)**. Anti-Candida properties of urauchimycins from Actinobacteria associated with trachymyrmex ants. *BioMed Research International*, 2013: 835081, 9 p.
- **MESBAH S. (2009)**. Sur le front des emergences. *Medecine Tropicale*. 69 : 27-32.

## Références bibliographiques

---

- **MUKAI A., FUKAI T., MATSUMOTO Y., ISHAKAWA J., HOSHINO Y., YAZAWA K., YAMAGUCHI K., ANDO A. (2006).** Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *The Journal of Antibiotics*. 59: 366-9.
- **MYTHILI B., AYYAPPA DAS. M.-A. (2011).** Studies on Antimicrobial Activity of *Streptomyces* spp. Isolates from Tea Plantation Soil. *Research Journal of Agricultural Sciences*. Vol: 2. N°: 1. Pp: 104-106.
- **NANJWAD B., CHANDRASHEHARA S., GOUDANAVAR P-S., SHAMAREZ A-M., MANVI F. (2010).** Production nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities.
- **NATHAN., ÉBERLIN. (1994)** Antibiotiques : classification et mode d'action, utilisation thérapeutique - Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2007) *Microbiologie*. De Boek et Larcier, que, 9-23.
- **NG Z-Y., AMSAVENI S. (2012).** Isolation, Screening and Characterization of Antibiotic Producing Actinomycetes from Rhizosphere Region of Different Plants from a Farm of Sungai Ramal Luar, Malaysia. *Journal of Advanced Biomedical & Pathobiology* Vol: 2 N°: 3. Pp: 96-107
- **NORMAK H-B., NORMAK S. (2002).** "Evolution and spread of antibiotic resistance." *Journal of Internal Medicine* 252: 91-106.
- **OKAMI Y., HOTTA K. (1988).** «Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». Academic Press, Orlando (Ed.), pp.33-67.
- **OMURA S., IWAI Y., TAKAHASHI Y., SADAKANE N., NAKAGAWA A., OIWA H. (2006).** Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics*. 32: 255-261.
- **OMURA S. (1992).** Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind. Microbiol.*, 10, 135-156 et la croissance de différentes plantes. Thèse doc : université Cheikh Anta Diop De Dakar. Pp : 157.
- **OSWALD E-T., FERCHAU H-A. (1968).** Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plant Soil*, 28: 187-192.

## Références bibliographiques

---

- **OUELHADJ A., AMEL A., SIZIENE K., DJENANE D. (2014).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*eucalyptus camaldulensis* récolte en algérie. Rev. Microbiol. Ind. San et Environn. Vol 8, N°2, p : 145-162.
- **OUHDOUCH Y. (2003).** Aperçu bibliographique sur la taxonomie des actinomycètes. Premier atelier national du réseau NAFRINET-MAROC. Pp : 18-70. Paris 481 p.
- **OUHDOUCH Y., BARAKATE M., FINANCE C. (2001).** Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. European Journal of Soil Biology. 37: 69-74.
- **PAPAGIANNI M. (2004).** Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. biotechnology advances. Vol 22(3) : 189-259.
- **PARK Y.S., MOMOSE I., TSUNODA K., OKABE M. (1994).** Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. Applied Microbiology and Biotechnology. Vol 40 : 773-779.
- **PELMONT J. (2005).** Biodégradations et métabolismes: les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences : Grenoble. Pp : 798 pages.
- **PERRY J.-J., STALEY J.-T., LORY S. (2004).** Microbiologie. Dunod, Paris. 497–498.
- **PETROSYAN P., GARCIA-VARELA M., LUZ-MADRIGAL A., HUITRON C., FLORES M.-E. (2003)** *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 53, 269-273.
- **PIEPERSBERG W., DISTLER J. (1997).** Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In: Novel Processes and Control Technologies in the Food Industry, 2nd ed., vol. 7. VCH- Verlagsgesellschaft, Weinheim. (1997), pp : 397-488.
- **PINET J.-M., Demain A.-L. (1988).** Actinomycetes in biotechnology. An overview. In: Goodfellow, M., S. T. Williams and M. Mordarski (eds.). London, Academic Press, pp. 461-482.
- **PRAKASH A., SATYANARAYANA. T., JOHRI. B.- N. (2012).** Microorganisms in Environmental Management. Springer. Pp: 819.

## Références bibliographiques

---

- **PRESCOTT L-M., HARLEY J-P., KLEIN D-A. (2007)** Microbiologie. De Boek et Larcier,
- **PRESCOTT L-M., HARLEY J-P., KLEIN D-A. (2010).** Microbiologie. De Boeck : Bruxelles. 2eme édition Pp : 1088. Press, London. 9-26. *Rhodococcus aurivivax* sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether
- **PRESCOTT W.M., SHERWOOD M., WOOLVERTON J. (2013).** Microbiologie. 8e édition Bruxelles : 568p
- **RADHIKA S., BHARATHI S., RADHAKRISHNAN M., BALAGURUNATHAN R. (2011).** Bioprospecting of Fresh Water Actinobacteria : Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. Journal of Pharmacy Research. Vol 4. N° 8. Pp: 2584-2586
- **RAINEY F-A., WARD-RAINEY N., KROPPENSTEDT R-M., STACKEBRANDT E. (1996).** The genus *Nocardiopsis* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage proposal of *Nocardiopsaceae* fam. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology., 46, 1088-1092.
- **REGHIOUA F., BOUGHACHICHE L., OULMI H., ZERIZER M., KITOUNI A., BOUDEMAGH A., BOULAHFROU (2008).** Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. Sciences et technologie c – n°28 décembre (2008), pp.59-64
- **ROSSET R. (2003).** "Pasteur et les vétérinaires." Bulletin de la société Française d'histoire de la Médecine et des Sciences Vétérinaires 2: 1-25.
- **SABAOU N. (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies Algérienne: Systématique et ecologie. these de Doctorat Es-Sciences naturelles, option Microbiologie des sols, USTHB, Alger., p192
- **ŞAHIN N., UCUR A. (2003).** Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates, Turkish Journal of Biology 27(2): 79–84.
- **SANCHEZ S., DEMAÏN A-L. (2002).** Metabolic regulation of fermentation processes Enzyme and Microbial Technology. Vol 31 : 895-906
- **SANGLIER J-J., TRUJILLO M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. Bull. Soc. Fr. Microbiol., 12, (13) pages.

## Références bibliographiques

---

- **SATEESH V., NAIKPATIL., RATHOD J-L. (2011).** Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. 3(10). Pp :48-53.
- **SAUBOLLE M- A., SUSSLAND D. (2003).** Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J. Clin. Microbiol.* 41, 4497–4501.
- **SCHMITZER P-R.,GRAUPNER R-R.,CHAPIN E-L., FIELDS S-C., GILBERT J-R., GRAY J-A.(2000).**RibofuranosylAdenylosuccinateSynthetase Following Phosphorylation. *Natural Products*. 63: 777-781.
- **SHARMA D., KAUR T., CHADHA B-S., MANHAS. R-K. (2011).** Antimicrobial Activity of Actinomycetes Against Multidrug Resistant Staphylococcus aureus, E. coli and Various Other Pathogens. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research* December. Vol 10. N°: 6. Pp: 801-808.
- **SHEARER M-C. (1997).** Methods for the isolation of non-streptomycetesactinomycetes.*Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. 28: 91-8
- **SHIRLING E-B., GOTTLIEB D. (1976).** Retrospective evaluation of International Streptomyces Project taxonomy criteria, In: *Actinomycetes the boundary microorganisms*. Ed: Arai
- **SHIRLING E-B., GOTTLIEB D. (1969).** Cooperative description of type cultures of Streptomyces. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*19(4): 391–512
- **SHOMURA T., YOSHIDA J., AMANO S., KOJIMA M., INOUYE S., NIIDA T. (1975).** Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *The Journal of Antibiotics*. (1979) 5: 427-435.
- **SIBANDA T., LEONARD V., MABINYA L-V, MAZOMBA N., AKINPELU D-A., BERNARD K., OLANIRAN A-O., OKOH. A-I. (2010).** Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *International Journal of Molecular Sciences* .11. N° 7. Pp: 2612–2623.
- **SINGH L-S., MAZUMDER S., BORA T-C. (2009).**Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by salt- tolerant and

## Références bibliographiques

---

- alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale*(2009) 19: 225- 233.
- **SINGH S., BARUAH I., BORA T-C . (2006).** Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*. Vol 5: 217-221.
  - **SINGLETON P. (1994).** Bactériologie. Masson. France.
  - **SLAVICA B-I., SANDRA S-K., ZORAN B-T. (2005).**Uv/Vis analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates.*Biology and Medicine*, 12(1) : 44–46.
  - **SMAOUI S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes tropical *Journal of Pharmaceutical Research*. 9: 373-377. Université de Toulouse. France. 251p.
  - **SOMMER, P., BORMANN C., CÖTZ F. (1997).** Genetic and biochemical characterization of a new extracellular lipase from *Streptomyces cinnamomeus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63(9): 3553-3560.
  - **STEVENSON I. (1956).** Antibiotic activity of actinomycetes in soil and their controlling effects on root-rot of wheat *The Journal of General and Applied Microbiology*.. 14 : 440-448.
  - **STOVER C-K., PHAM X-Q. ERWIN A-L., MIZOGUCHI S-D., WARRENER P., HICKEY M-J, BRINKMAN F-S., HUFNAGLE W-O., KOWALIK D-J., LAGROU M., GARBER R-L, GOLTRY L., TOLENTINO E., WESTBROCK-WADMAN S., YUAN Y., BRODY L-L., COULTER S-N., FOLGER K-R., KAS A., LARBIG K., LIM R., SMITH K., SPENCER D., WONG G-K., WU Z., PAULSEN I-T., REIZER J., SAIER M-H., HANCOCK R-E, LORY S., OLSON M-V. (2000).** Complete genome sequence of *Pseudomonasaeruginosa*PA01, an opportunistic pathogen. *Nature*. 406: 959-964.
  - **STRUB C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. 174p.
  - **STURDIKOVA M., STURDIK E. (2009).** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta ChgimicaSlovaca*. 2 : 63-74.
  - **SUELA SILVA M., NAVES SALES A., TEIXEIRA MAGALHÃES-GUEDES K., RIBEIRO DIAS D., SCHWAN R-F. (2013).** Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. *Biomed Res Int*, 2013: 503805.

## Références bibliographiques

---

- **SUMMERS A-O. (2006).** Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotics multi resistance problem. *Animal Biotechnology*. 17: 125-135.
- **TAKAHASHI Y., OMURA S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of Genetic Applied Microbiology*. 49: 141-154. the case of streptogramins. *Cur Drug Targets Infect Disord*. 1: 215-225.
- **TAMER A-Ü., AZERI C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3(9) : 441–446.
- **THUMAR J-T., SINGH S-P. (2007).** Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces clavugerus* strain Mit-1. *Brazilian Journal of Microbiology*. Vol 38.
- **TOKALA, R-K., STRAP J-L, JUNG C-M., CRAWFORD D-L., LOVEM-H-S., DEOBLAD L-A., BAILEY J-F., MORRA M-J. (2002).** Novel plant-microbe rhizosphere interaction involving *Streptomyces lydicus* WYEC108 and the pea plant (*Pisum sativum*). *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2161-2171. 2000-Practical *Streptomyces* Genetics. The John Innes Foundation, Norwich, UK :613.
- **TORTORA G-J., FUNKE B-R., CASE C-L. (2003).** Introduction à la Microbiologie. Editions du Renouveau Pédagogique. France.
- **TORTORA G-J., FUNKE B-R., CASE C-L. (2012)** Introduction à la microbiologie . Edition de Renouveau pédagogique, Québec: 152-408.
- **TORTORANO A-M., CABRINI E., VIVIANI M-A. (1979).** Sensibilité in vitro des levures à cinq antifongiques. Comparaison de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Mycologie médicale* , 8, 69-74. Toulouse, (France). pp251.
- **TOUSSAINT V. (1996).** Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycete EF76 antagoniste à *Phytophthora fragariae* var. *Rubi* causant le pourridié des racines du framboisier. Mémoire de maître ès des sciences. Université de sherbrooke, Quebec, Canada., p52.
- **TULKENS P., VAN BAMBEKE V. (2008).** Pharmacologie et Pharmacothérapie Antiinfectieuse. Syllabus national belge de pharmacologie.
- **ULLAH I., MASOOD ARSHAD M, CHUADHRY I-J-M., NOUREEN U., JADOON W-A., JADOON M-A. (2012).** Actinomycetes screening for bioactive

## Références bibliographiques

---

potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. Rec. Zool. Surv. Pakistan. Vol :21. Pp: 10-13

- **VALLI S. SUGASINI. S., AYSHA O-S, NIRMALA P., VINOOTH KUMAR P., REENA. (2012).** A. Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. Pp: 469-473.
- **VANDEPUTTE V. (2008).** Mécanismes moléculaires de la résistance aux antifongiques chez *Candida glabrata*. Thèse de Doctorat. Université d'Angers, (France).pp 168.
- **VIMAL V., RAJAN B-M., ETKANNABIRA K. (2009).** Antimicrobial activity of marine actinomycete, *Nocardiosis* sp. VITSVK 5 (FJ973467). Asian Journal of Medical Sciences . 01 : 5763.
- **WAKSMAN S-A., HENRICI A-T. (1943).** The nomenclature and classification of the actinomycetes. Journal of Bacteriology, 46(4): 337–341.
- **WALCH C. (2000)** Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. Nature. 406: 775-781.
- **WALSH C., TRAUJER J., COURVALIN P., DAVIES J. (2001).** Adapté à partir du poster des mécanismes d'action et de la résistance aux antibiotiques. Trends In Microbiology, the Lancet Infectious Diseases, Current Opinion in Microbiology, Trends In Molecular Medicine.
- **WANG J., SOISSON S-M. (2006).** Platensimycine is a selective Fab F inhibitor with potent antibiotic properties. Nature. 441: 358-361.
- **WILLIAMS P-G. (2009).** Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. Trends Biotechnol. 27 : 45-52.
- **WILLIAMS S.T., GOODFELLOW M., ALDERSON G. (1989)** Genus *Streptomyces*, dans: Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (volume 4). Williams ET Wilkins, USA: 2452-2492.
- **WILLIAMS S-T., CROSS T. (1971).** "Actinomycetes." In : Methods in microbiology. Booth C. Ed., Academic Press, London. 4, 295-334.
- **WILLIAMS S-T., LANNING S., WELLINGRON E-M-H. (1993).** Ecology of actinomycetes. In: The biology of actinomycetes. M. Goodfellow et al., eds. Academic press, London, pp. 481 - 528.
- **WILLIAMS S-T., LOCCI R., BESWICK A., KURTBOKE D-I., KUZNETSOV V-D., LE MONNIER F-J., LONG P-F., MAYCROFT K-A., PALMA R-A.,**

## Références bibliographiques

---

- PETROLINI B., QUARONI S., TODD J-I., WEST M. (1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Research in Microbiology*, 144(8): 653–656. T. Tokyo. 9–42.
- **WILLIAMS S-T., WELLINGTON E- M-H. (1982).** Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53, 1907-1915.
  - **WILLIAMSON N-R., FINERAN C-P., LEEPER F-J., SALMON P-C. (2006).** The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review*. Vol 4.
  - **WOO JUNG-HEE., KITAMURA E. (2002).** An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strains AP77 is specific for phythiumporphyræ, a causative agent of red rot disease in porphyra spp. *Applied and Environmental Microbiology*. 68: 2666-2675
  - **WRIGHT G-D. (2007).** The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity.
  - **ZAKHAROVA O-S., RENOVA G-M., ZVYAGINTSEV D-G. (2003).** Some approaches to the selectives isolation of actinomycetes of the genus *actinomadura* from soil. *Microbiology*. 72: 110-113
  - **ZITOUNI A., LAMARI L., BOUDJELALE H., BADJI B., SABAOU N., GAOOUAR A., et al., (2005).** *Saccharothrix algeriensis* sp. Nov., isolated from a sahara soil. *IJSEM*
  - **ZOUAGHI A. (2007).** Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage : 12p

### Annexe 1:

#### Composition des milieux de culture utilisés

##### **Bennett**

- ❖ Extrait de levure .....2g
- ❖ Extrait de viande .....1g
- ❖ Peptone .....2g
- ❖ Glucose .....10g
- ❖ Agar..... 20g
- ❖ Eau distillée .....1000 ml
- ❖ pH 7,2

##### **Sabouraud**

- ❖ Peptone ..... 10g
- ❖ Glucose .....40g
- ❖ Agar.....20g
- ❖ Eau distillée.....1000mL
- ❖ pH 5,6

##### **Muller Hinton**

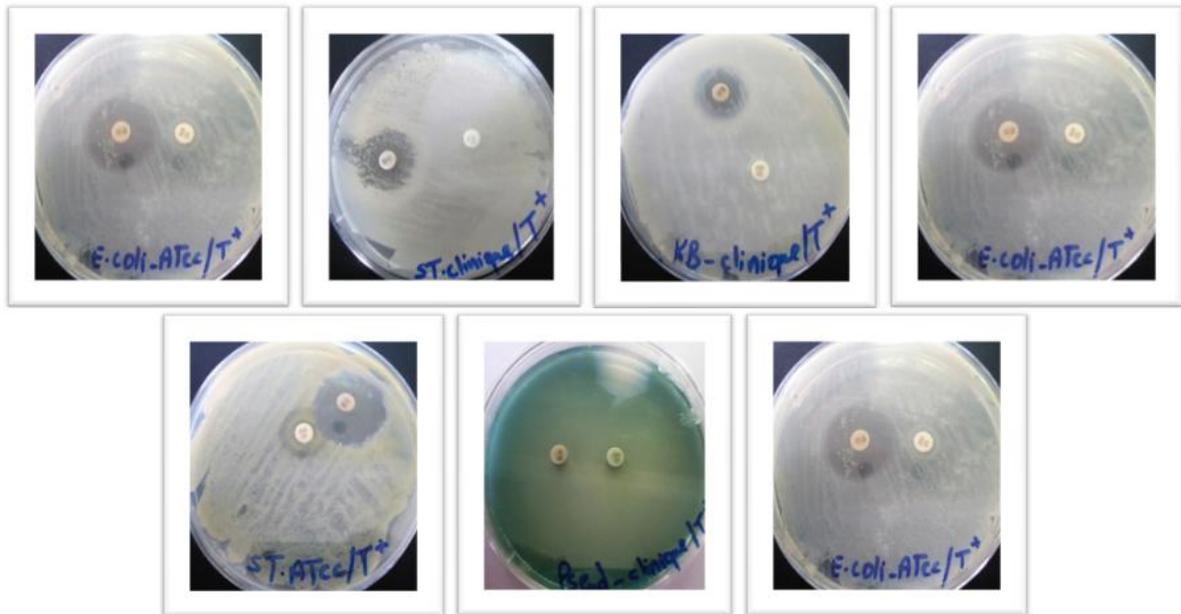
- ❖ Extrait de viande .....3g
- ❖ Amidon .....1,5g
- ❖ Hydrolysate acide de caséine .....17,5g
- ❖ Agar.....18g
- ❖ pH = 7,4

##### **Milieu caséinase**

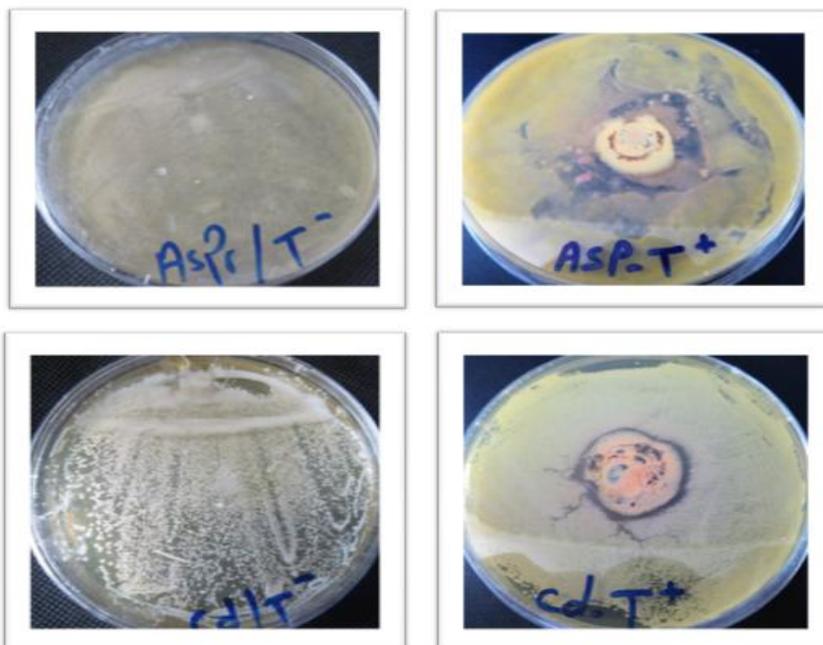
- ❖ Extrait de levure .....2g
- ❖ Extrait de viande .....1g
- ❖ Peptone .....2g
- ❖ Glucose .....10g
- ❖ Agar..... 20g
- ❖ Eau distillée .....1000 ml
- ❖ lait écrémé .....100g
- ❖ pH 7,2

## Annexe

**Annexe 2:** Témoins positifs et négatifs des germes cibles vis-à-vis des différents antibiotiques utilisés.



**Figure 1 :** Les zones d'inhibitions obtenues avec les disques d'antibiotiques (Oxytétracycline et l'Ampicilline) vis-à-vis des bactéries cibles.



**Figure 2 :** Les témoins positifs (Amphotéricine B) et négatifs obtenus vis-à-vis d'*Aspergillus niger* et *Candida albicans*.

## Annexe

### Annexe 3:

**Tableau 1::** Cinétique de croissance de la souche SP22.

Temps(jours)	DO(620nm)	pH
0	0,24	6,68
2	0,328	5,5
4	0,776	5,2
6	0,85	4,85
8	0,837	5,01
12	0,694	6,5

**Tableau 2::** Cinétique de croissance de la souche SP23.

Temps(jours)	DO(620nm)	pH
0	0,08	6,68
2	0,276	5,5
4	0,542	5,9
6	0,6	5,5
8	0,631	5,66
12	0,588	7,01

### Annexe 4 : Cinétique de production des molécules bioactives par la souche SP22 et SP23

**Tableau1 :** Diamètres des zones d'inhibitions en fonction du temps d'incubation de la souche SP22 vis-à-vis des bactéries cibles.

Temps \ Bactéries	Bactéries					
	<i>E.coli</i> ATCC	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
2 jours	06	12±1,75	10±2	10±0,75	06	06
4 jours	10±2	12±0,75	06	06	06	13±1
6 jours	06	06	12±1	20±1	12±1	06
9 jours	06	06	10±1.5	10±1,5	17±2,5	06

## Annexe

**Tableau 2::** Diamètres des zones d'inhibition en fonction du temps d'incubation de la souche SP23 vis-à-vis des bactéries cibles.

Temps \ Bactéries	Bactéries					
	<i>E.coli</i> ATCC	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
2 jours	06	10±1	10±1	06	06	11±2
4 jours	21±0,5	15±2	18±1,75	22±1,5	06	13±1,75
6 jours	06	20±1	10±2	06	06	06
9 jours	06	27±1	11±1	06	10±2	06

### Annexe 5:

**Tableau 1:** Résultats de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques de la souche SP22 et SP23.

Souches \ Germe cibles	Souches	
	SP22	SP23
<i>E.coli</i>	17±1	10±0,5
<i>E.coli</i> ATCC	8±1,33	0
<i>S. aureus</i>	16±0	10±1,5
<i>S. aureus</i> ATCC	15±1	15±2
<i>P. aeruginosa</i>	19±0	14±0,75
<i>K.pneumoniae</i>	9±1,5	10±1,75

**Tableau 2:** Sensibilité des bactéries cibles vis-à-vis des différents extraits organiques (Acétate d'éthyle et n-hexane) de la souche SP22.

Solvants organiques \ Germe cibles	Solvants organiques	
	Acétate d'éthyle	n-hexane
<i>E.coli</i>	23±1,5	0
<i>E.coli</i> ATCC	15±2	0
<i>S. aureus</i>	23±1,75	0
<i>S.aureus</i> ATCC	17±0	0
<i>P. aeruginosa</i>	6	0
<i>K.pneumoniae</i>	16±0,5	0

## Annexe

**Tableau 3 :** Sensibilité des bactéries cibles vis-à-vis des différents extraits organiques (Acétate d'éthyle et n-hexane) de la souche SP23.

Solvants organiques Germe cibles	Acétate d'éthyle	n-hexane
<i>E.coli</i>	28±2	15±0
<i>E.coli ATCC</i>	14±1	13±1
<i>S. aureus</i>	20±1,5	10±2
<i>S. aureus ATCC</i>	21±1	0
<i>P. aeruginosa</i>	20±1,5	0
<i>K.pneumoniae</i>	11±2	0

**Annexe 6:** Stabilité des molécules bioactives par les deux souche SP22 et SP23 aux paramètres du pH et de la température.

**Tableau 1 :** Diamètres des zones d'inhibition obtenues en fonction du pH par la souche SP22.

Germes pH	<i>E.coli</i>	<i>E.coli ATCC</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus ATCC</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
3	21±1	12±0	25±1,33	20±0,75	25±2	12±1
5,6	23±1,5	15±0,75	23±1,75	17±1	06	16±1,5
7	06	10±2	15±2	13±1	06	11±2
11	06	06	25±1	15±1	06	15±1

**Tableau 2::** Diamètres des zones d'inhibition obtenues en fonction de la températures par la souche SP22

Germes Températures	<i>E.coli</i>	<i>E.coli ATCC</i>	<i>S.aureus</i>	<i>S.aureus ATCC</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
T=4°	20±0	15±1	21±2	18±1,5	15±1,75	20±0
Tm	23±2	15±2	23±1	17±2	06	16±0
T=110°	10±1,75	10±1,75	16±1	15±1,5	06	06

## Annexe

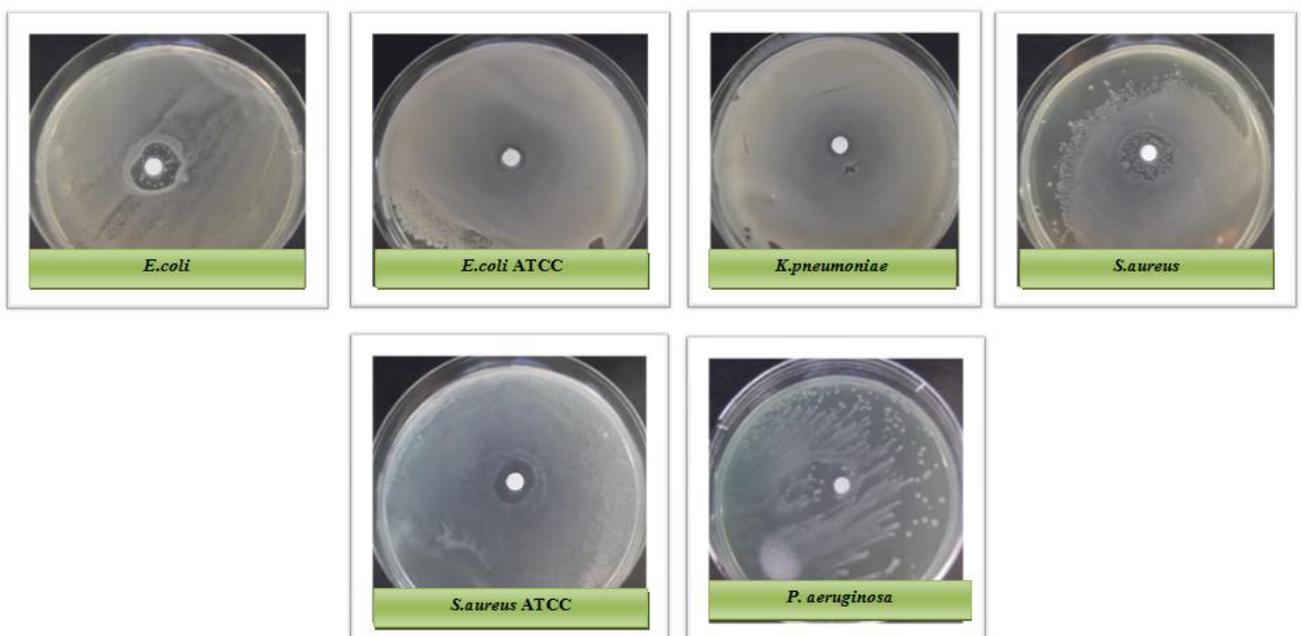
**Tableau 3:** Diamètres des zones d'inhibition obtenues en fonction du pH parla souche SP23.

Germes pH	<i>E.coli</i> ATCC	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>P.aeruginosa</i>
3	06	11±0,75	12±2	06	10±2	20±1,75
5,8	14±1,75	28±0,5	20±1,5	21±2	11±1	20±0,75
7	27±1	15±1	26±2	06	10±1	06
11	06	06	16±1	06	06	06

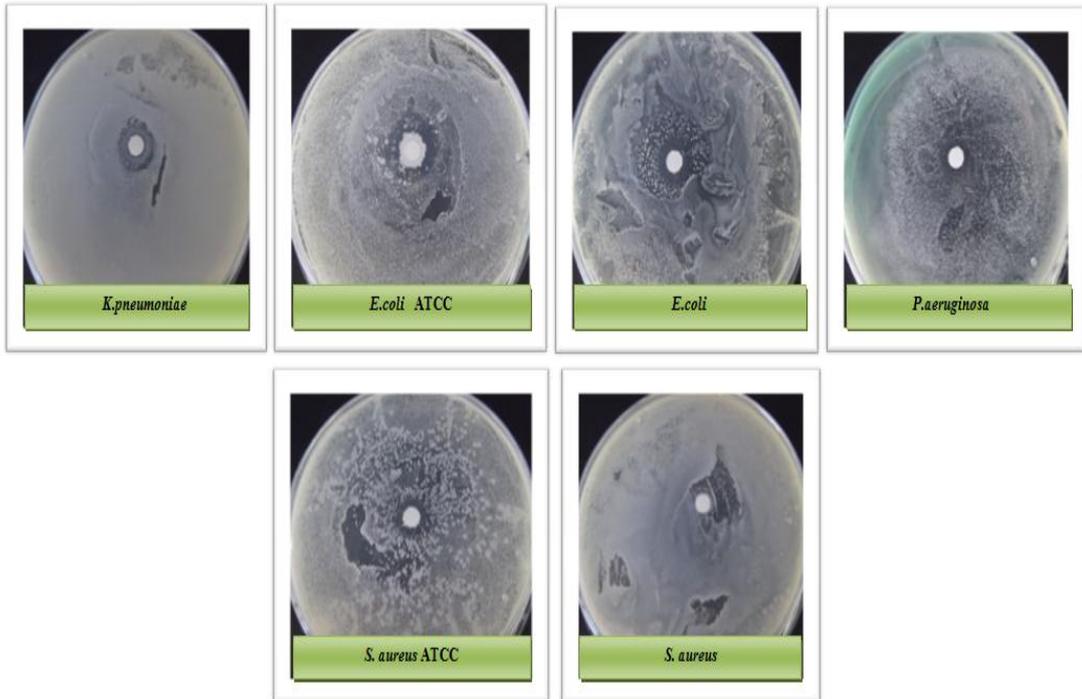
**Tableau 4::** Diamètres des zones d'inhibition obtenues en fonction de la températures par la souche SP22.

Germes Température	<i>E.coli</i> ATCC	<i>E.coli</i>	<i>S.aureus</i> ATCC	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>
4°C	15±1,5	20±2	17±2,5	25±0,5	15±2	14±2
Tm	14±2	28±1	21±0,75	20±2	20±2,5	11±1
110°C	06	06	06	06	23±1	06

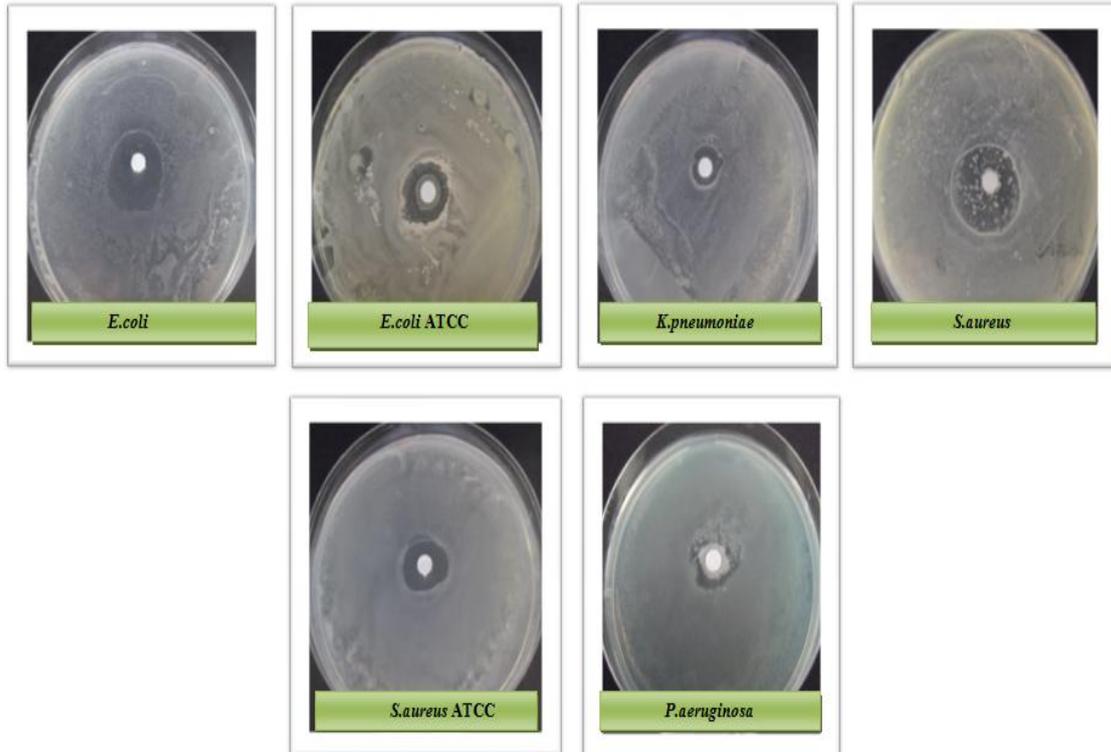
**Annexe7**Extraction des molécules bioactives à partir du mycélium des souches SP22 et SP23 respectivement (les extraits méthanoliques ).



## Annexe

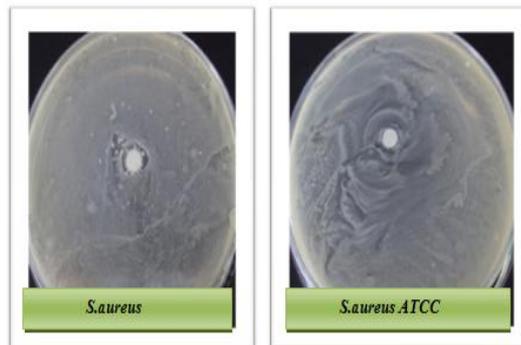
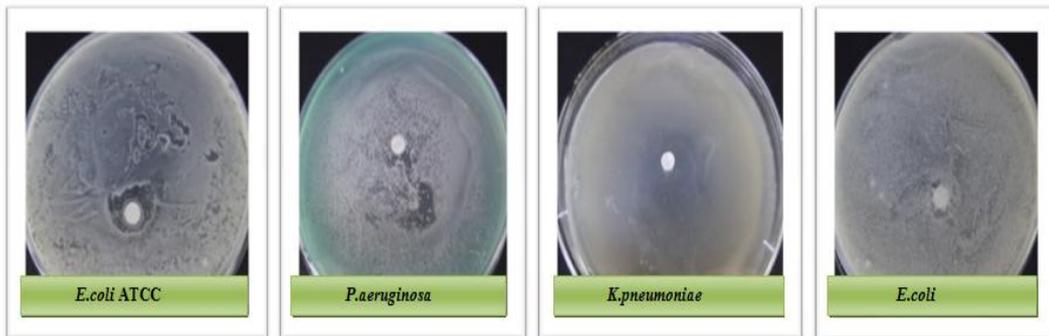
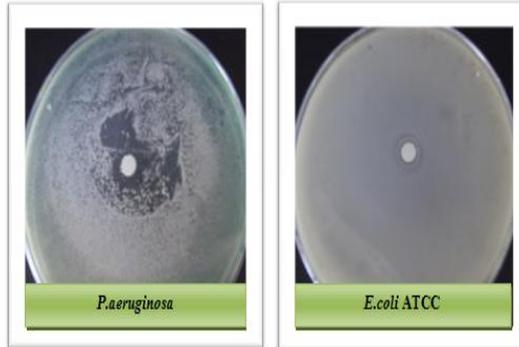
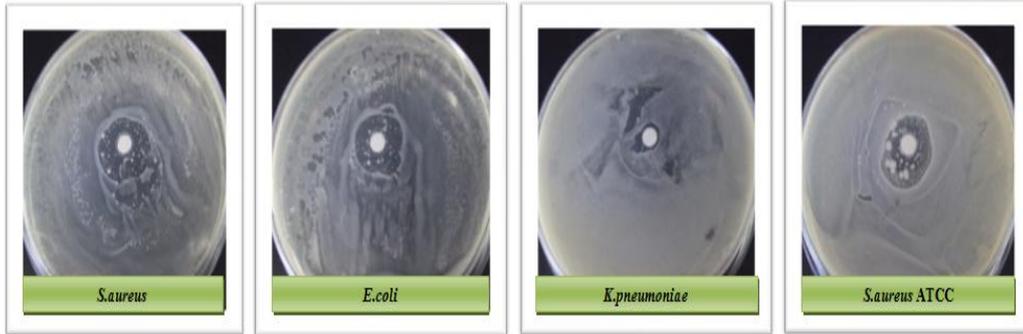


**Annexe8** Extraction des molécules bioactives à partir du surnageant des souches SP22 et SP23 respectivement (les extraits d'acétate d'éthyle(SP22,SP23) et le n-hexane(SP23)).



# Annexe

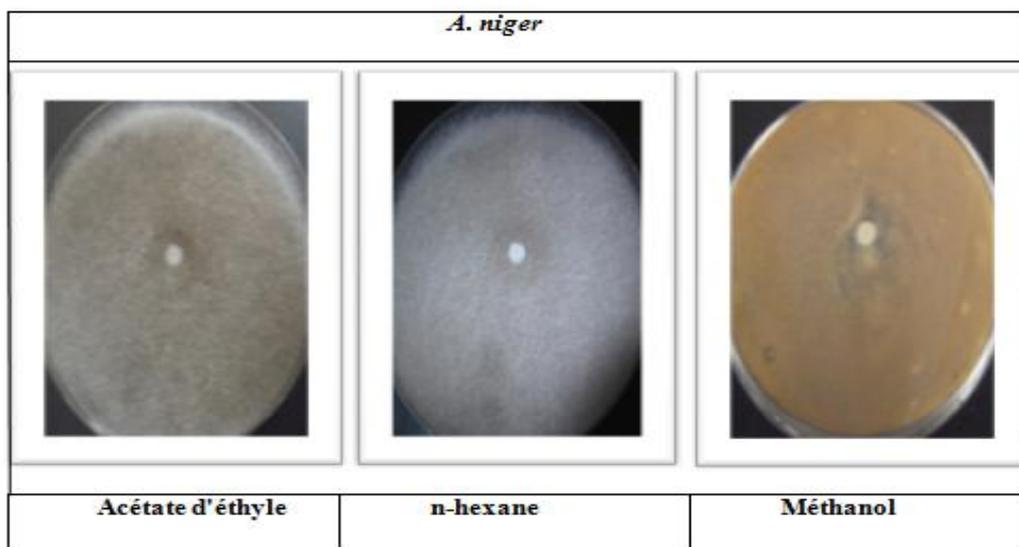
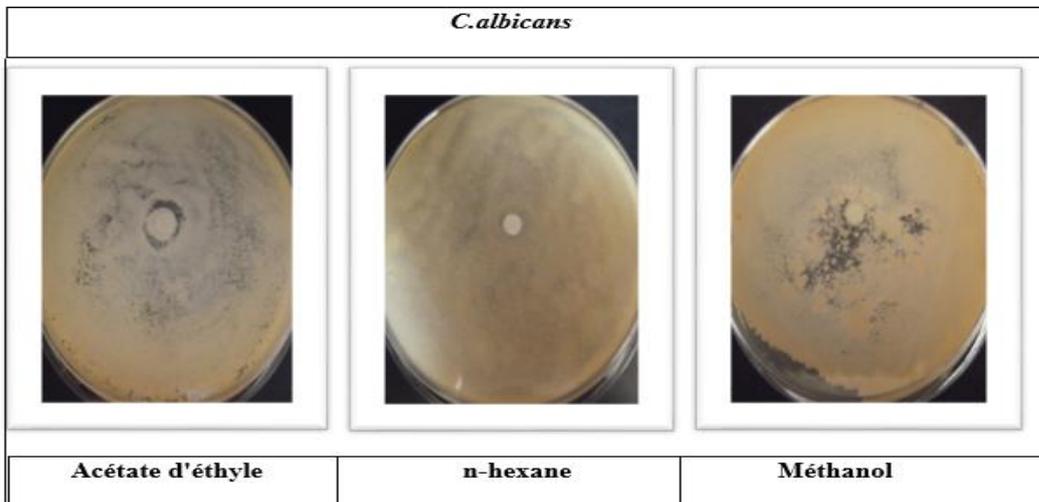
---



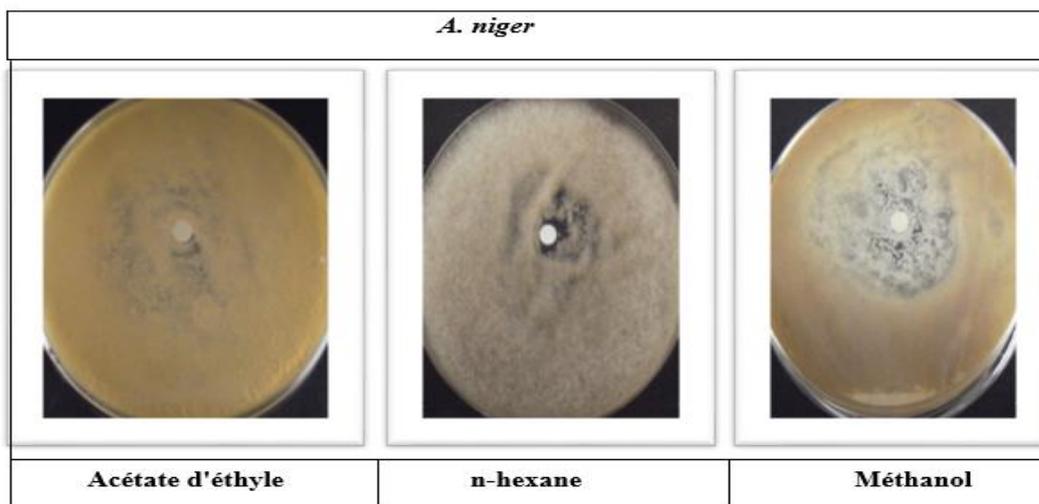
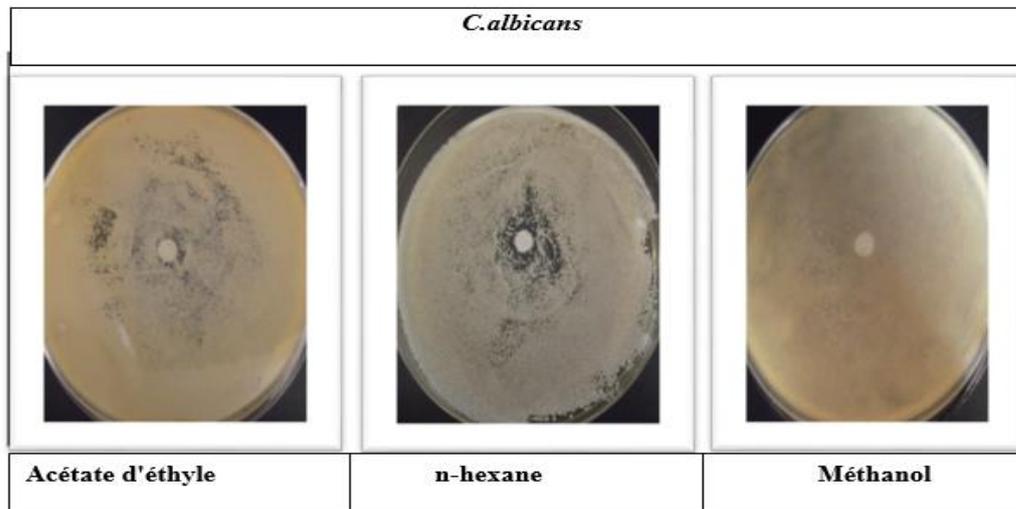
## Annexe

**Annexe 9** Evaluation de l'activité antifongique des extraits organiques pour les deux souches SP22 et SP2.

### SP22

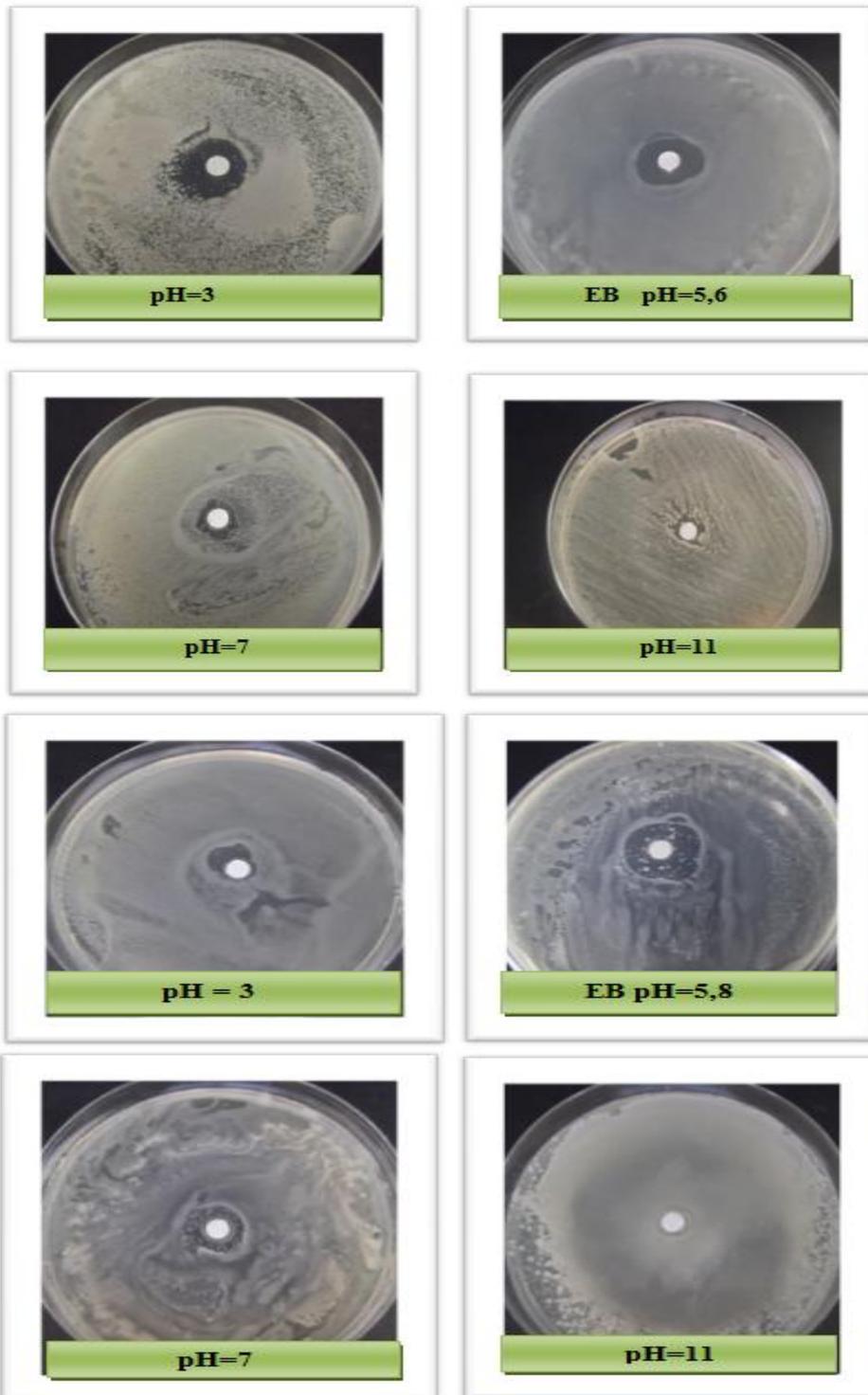


**SP23**



## Annexe

### Annexe 10 Effet de la variation du pH des souches SP22 et SP23 respectivement

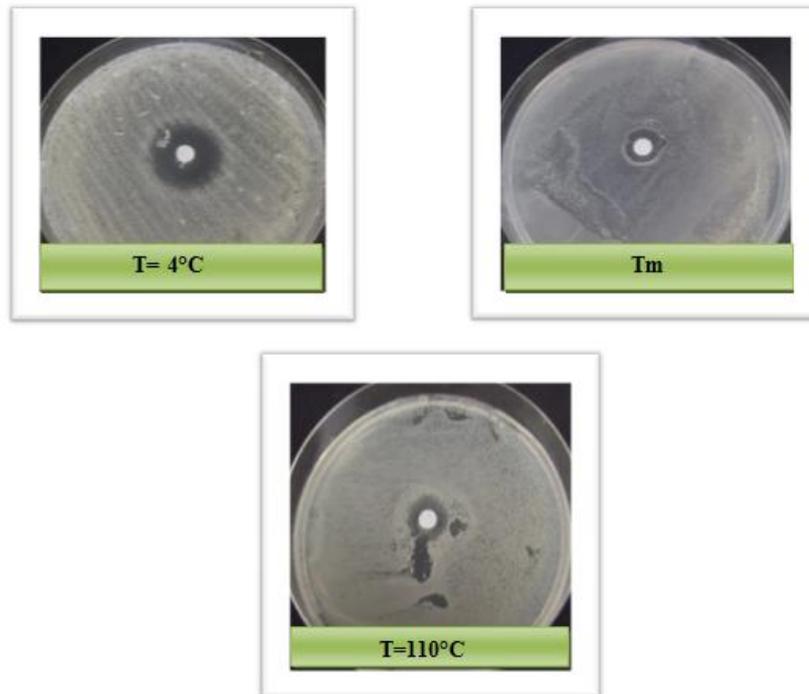


## Annexe

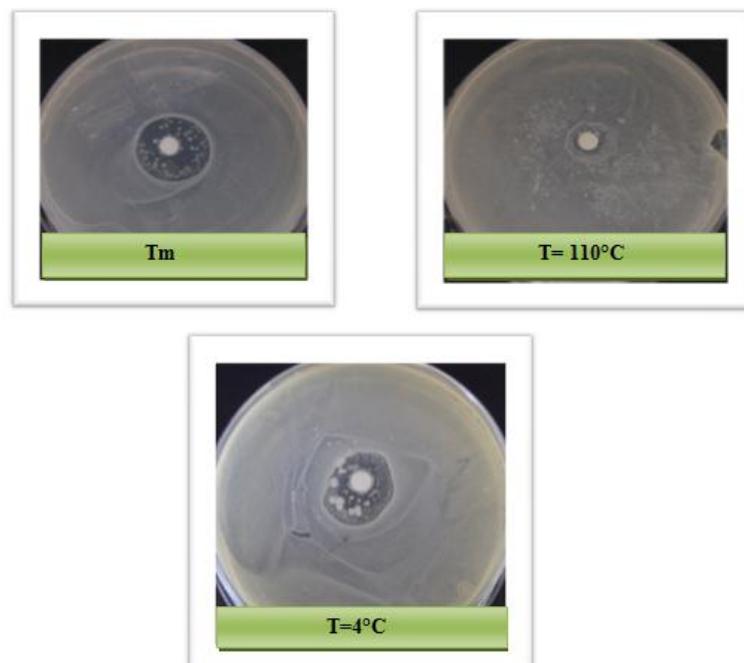
---

### Annexe 11 Effet de la température

#### SP22

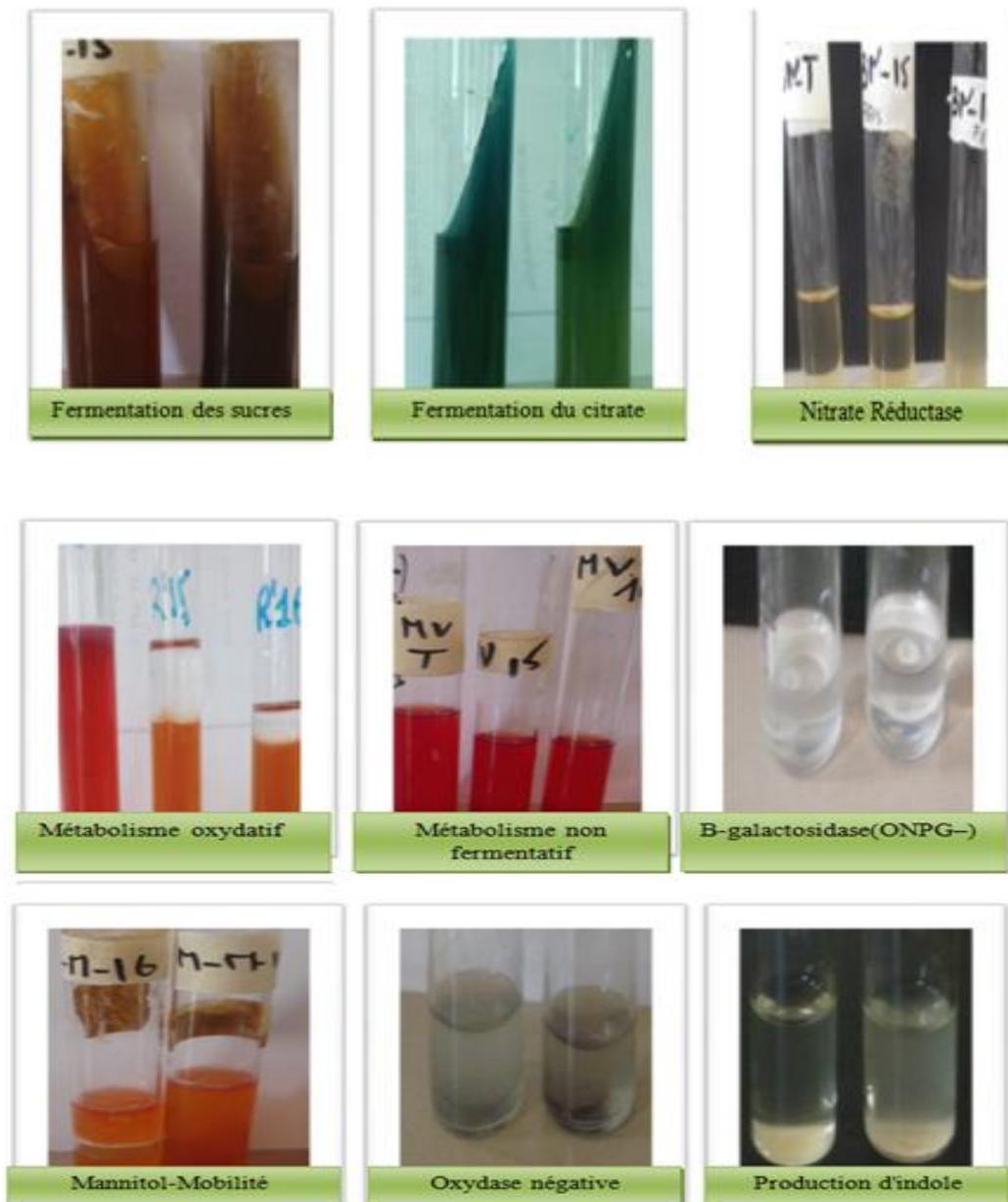


#### SP23



## Annexe

### Annexe 12: Galerie biochimique



**Figure 1**: Résultats des différents tests biochimique réalisés .