

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique
Université MOULOUD MAMMERY de 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 : Microbiologie Appliquée

Thème

Recherche et caractérisation préliminaire de substances
antimicrobiennes et possibilité de production
enzymatique à partir de souche d'actinomycètes.

Travail réalisé par :
BOUMAZA Khelifa
BOUZEGANE Salim

Soutenu le : 28 septembre 2016

Devant le jury :

Président : Mr DJENANE D. :	Professeur à l'UMMTO
Promoteur : Mr OUELHADJ A. :	Maitre de conférences A à l'UMMTO
Examineur : Mr TAZDAIT D. :	Maitre de conférences B à l'UMMTO
Examineur : Mr MEDJKOUN N. :	Maître assistant A à l'UMMTO

Année universitaire : 2015 - 2016

Remerciements

Avant toute chose, nous tenons à remercier en premier lieu le Bon Dieu de nous avoir donné la force, la volonté et le courage pour terminer ce modeste travail.

Nous remercions très sincèrement :

*Notre promoteur **Monsieur OUELHADJ. A** : Maitre de conférences A à l'UMMTO, pour nous avoir permis de travailler sur un thème aussi novateur, riche et passionnant et pour nous avoir su donner les bonnes directions et orientations.*

***Monsieur DJENANE D.** : Professeur à l'UMMTO de nous avoir fait l'honneur d'être le président du jury*

***Monsieur TAZDAIT D.** : Maitre de conférences B à L'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

***Monsieur MEDJKOUN N.** : Maitre-assistant A à l'UMMTO, pour avoir accepté d'examiner notre travail.*

Enfin tous nos remerciements à nos amis, et camarades pour l'amitié et la sympathie qu'ils nous ont témoigné et à tous ceux et celles, qui de près ou de loin, ont contribué à la réalisation de ce mémoire.

DÉDICACES

Je remercie tout d'abord mon Dieu de m'avoir donné courage, patience et conscience afin de bien rédiger ce modeste travail.

Je dédie ce travail :

A mes très chers parents que dieu me les gardes à qui je dois mon éducation, et ma réussite.

A mon frère et à ma sœur Meziane et Ouardia.

A toute ma famille.

A tous mes amis surtout Thinhinane.

A tous mes camarades de l'université.

KHELIFA

DÉDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

À mes très chers parents auxquels je dois toute ma vie et toutes mes réussites. Que Dieu leur procure bonne santé et longue vie.

À mon frère Amirouche.

À toute ma grande famille.

Aux personnes qui m'ont toujours aidé et soutenu, qui étaient toujours à mes côtés, mes aimables amis pour leur motivation et leur encouragement pour finir ce travail.

À tous mes camarades que je remercie pour cette bonne ambiance, leurs bonnes humeurs, mais aussi pour leur soutien et leurs conseils.

SALIM

Liste des abréviations

Index des tableaux et des figures

Introduction1

Synthèse bibliographique

Chapitre 1: Actinomycètes

1. Historique	3
2. Caractères généraux.....	3
3. Vue générale du métabolisme	5
4. Culture et morphologie des actinomycetes.....	7
4.1. Le mycélium	8
4.1.1. Mycélium primaire	8
4.1.2. Mycélium secondaire.....	9
4.2. La formation des spores.....	10
4.2.1. Les exospores	10
4.2.2. Les endospores	10
5. Taxonomie et critères d'identification.....	12
5.1. Critères cultureux et macromorphologiques	12
5.2. Critères micromorphologiques	13
5.3. Critères chimio-taxonomiques.....	13
5.3.1. Les sucres	14
5.3.2. Les acides aminés	14
5.3.3. Les lipides.....	15
5.3.3.1. Les lipides polaires	16
5.3.3.2. Les ménaquinones	16
5.3.3.3. Les acides mycoliques.....	16
5.3.3.4. Les acides gras.....	16
5.4. Critères physiologiques	17
5.5. Critères moléculaires	17
5.5.1. Coefficient de Chargaff	17
5.5.2. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S.....	18
6. Ecologies et distribution des actinomycètes dans la nature.....	20
7. Les actinomycètes en biotechnologie.....	21

Chapitre 2 : Les antibiotiques et les antifongiques produits par les actinomycètes

1. les antibiotiques produits par les actinomycètes	27
1.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane.....	27
1.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	28
1.2.1. Macrolides, Lincosamides, Streptogramines.....	29
1.2.2. Les phénicolés : chloramphénicol et thiamphénicol	30
1.2.3. Les aminoglycosides	31
1.2.4. Les tétracyclines	31
1.3. Antibiotiques agissant au niveau de l'ARN polymérase.....	32
1.3.1. Les ansamycines.....	32
1.3.2. La streptolydigne.....	32
1.3.3. La lipiarmycine.....	33
1.3.4. Le peptide GE23077.....	33
1.3.5. Les pyrrothines	33
2. Les antifongiques.....	34
2.1. Les antifongiques produits par les actinomycètes (les polyènes).....	34
2.1.1. La nystatine	34
2.1.2. Amphotéricine B	34
2.2. La nikkomycine.....	35
2.3. Mode d'action des polyènes	35
3. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes	35
3.1. Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes	36
3.1.1. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques.....	36
3.1.2. Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques.....	37
3.1.3. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques.....	37
3.2. Effet du pH, de la température et du temps d'incubation.....	38

Chapitre 3 : Résistance bactériennes aux antibiotiques

1. Généralités sur les antibiotiques.....	39
2. Définition de la résistance	39
3. Bases génétiques de la résistance	40
3.1. Résistance naturelle.....	40

3.2. Résistance acquise	41
4. Mécanismes de résistance.....	42
4.1. Mutation de la cible de l'antibiotique.....	42
4.2. Modification de la cible de l'antibiotique	42
4.3. Surexpression de la cible de l'antibiotique.....	43
4.4. Modification de l'antibiotique.....	43
4.5. Réduction de la perméabilité membranaire	43
4.6. Résistance par efflux	43
5. Recherche de nouvelles molécules antibiotiques	44

Matériel et méthodes

Partie I : Matériel

1. Souches d'actinomycètes.....	45
2. Matériel de laboratoire	45
3. Appareillage	46
4. Choix des microorganismes cibles	46
5. Les antibiotiques et antifongiques utilisés.....	47

Partie II : Méthodes

1. Caractérisation partielle des souches d'actinomycètes.....	47
1.1. Critères morphologiques	47
1.1.1. Macromorphologie	47
1.1.2. Micromorphologie	47
1.2. Coloration de Gram	47
1.3. Critères biochimiques.....	48
1.3.1. Recherche de la β -galactosidase.....	48
1.3.2. Recherche de l'oxydase	48
1.3.3. Recherche de la catalase.....	48
1.3.4. Recherche de la Nitrate Réductase.....	48
1.3.5. Etude de la fermentation des sucres (Glucose, Lactose, Saccharose) et recherche du caractère H ₂ S à l'aide du milieu d'identification TSI	49
1.3.6. Utilisation du citrate comme seule source de carbone	50
1.3.7. Caractère mannitol mobilité	51

1.3.8. Détermination de la voie d'attaque des glucides	51
1.3.9. Caractères Rouge de Méthyle et Voges Proskauer.....	52
1.3.10. Recherche de la production d'indole	52
1.4. Hydrolyse de l'amidon	53
1.5. Hydrolyse de la caséine	53
1.6. Action sur le lait écrémé.....	53
2. Evaluation de l'activité antimicrobienne.....	53
2.1. Repiquage des espèces microbiennes.....	53
2.2. Standardisation des souches	53
2.2.1 Standardisation des souches d'actinomycètes	53
2.2.2. Standardisation de l'inoculum des bactéries cibles	54
2.2.3. Standardisation de l'inoculum des souches fongiques	54
2.3. Recherche de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar.....	55
2.3.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne.....	55
2.3.2. Mise en évidence de l'activité antifongique.....	55
3. Extraction des substances bioactives avec des solvants organiques	55
3.1. Culture en milieu liquide	55
3.2. Extraction à partir du culot.....	56
3.3. Extraction à partir du surnageant.....	56
4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits (technique des disques en papier).....	58
5. Etude de la stabilité des extraits	59
5.1. Effet du pH	59
5.2. Effet de la température	59
6. Analyse statistique.....	59

Résultats et discussion

1. Etude morphologiques, physiologiques et biochimiques des trois souches	60
1.1. Morphologie	60
1.1.1. Macromorphologie	60
1.1.2. Micromorphologie.....	62
1.2. Physiologique et biochimique	62
2. Recherche de l'activité antimicrobienne par la méthode des cylindres d'agar	67
2.1. Test d'activité antibactérienne.....	73

2.2. Test d'activité antifongique.....	74
3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits organiques.....	76
4. Effet du pH et de la température sur la production d'antimicrobien par les souches actinomycétales S2 et S3	87
Conclusion et perspectives	94

Références bibliographiques

Annexes

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AMAC : Aminosidesaminocyclitols.

ARNp : ARN polymérase.

ANOVA : Analyse de la variance.

AM /AX : Amoxicilline.

ATB : Antibiotique.

ATCC : American Type Culture Collection.

CaChs : Calcium chitine synthase.

Chs : Chitine synthase.

C.H.U. : Centre Hospitalo-Universitaire.

CMI : Concentration minimale inhibitrice.

DAP : Diaminopimélique.

DO : Densité optique.

EDS : Eau distillé stérile.

GC : Guanine-Cytosine.

M : Molaire.

MA : Mycélium aérien.

MS : Mycélium du substrat.

MH : Muller-Hinton.

MLS : Macrolides, Lincosamides, Streptogramines.

O : Oxytétracycline.

ONPG : Ortho-nitrophényl- β -galactoside.

PCR : Réaction de Polymérase en Chaîne.

RPM : Rotation par minute.

SARV : *Staphylococcus aureus* résistant à la vancomycine.

SD : Ecart type.

UFC : Unité Formant Colonie.

INDEX DES TABLEAUX

Numéro du tableau	Titre du tableau	page
Tableau I	Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires	6
Tableau II	Sucres cellulaires totaux des actinomycètes	14
Tableau III	Types de parois des actinomycètes en fonction des constituants en acides aminés et en sucres	15
Tableau IV	Valeur du coefficient de Chargaff pour les différents genres d'actinomycétales	17
Tableau V	Répartition des actinomycètes dans la nature	20
Tableau VI	Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes	22
Tableau VII	Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes	24
Tableau VIII	Quelques exemples d'extrêmozymes produites par les actinomycètes	25
Tableau IX	Nombre approximatif de métabolites bioactifs découverts entre 1940 et 2010 en fonction des microorganismes producteurs	26
Tableau X	Effet inhibiteur de certaines sources de carbone rapidement assimilable sur la biosynthèse d'antibiotiques	37
Tableau XI	Production d'antibiotiques chez les actinomycètes favorisée par les acides aminés	38
Tableau XII	Produits chimiques et milieux de culture utilisés	45
Tableau XIII	Les souches microbiennes utilisées	46
Tableau XIV	Les antibiotiques et l'antifongique utilisés	47

Tableau XV	Caractéristiques macromorphologiques des souches S1, S2 et S3	60
Tableau XVI	Aspect microscopique des trois souches d'actinomycètes	62
Tableau XVII	Quelques Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales	63
Tableau XVIII	Activité antibactériennes des trois souches d'actinomycètes déterminée par la méthode des cylindres d'agar (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2)	69
Tableau XIX	Activité antifongiques des trois souches d'actinomycètes déterminée par la méthode des cylindres d'agar. (Diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2)	69
Tableau XX	Activité antibactériennes des extraits organiques des trois souches d'actinomycètes déterminée par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2)	76
Tableau XXI	Activité antifongiques des extraits organiques des trois souches d'actinomycètes déterminée par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2)	77
Tableau XXII	Effet du pH et de la température sur l'activité antimicrobienne des extraits organiques de la souche actinomycétale (S2) déterminée par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2)	87
Tableau XXIII	Effet du pH et de la température sur l'activité antimicrobienne des extraits organiques de la souche actinomycétale (S3) déterminée par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2)	88

INDEX DES FIGURES

Numéro de la figure	Titre de la figure	Page
Figure 1	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	7
Figure 2	les classes morphologiques d'actinomycètes cultivées en milieu liquide	8
Figure 3	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète montrant le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores	9
Figure 4	Morphologie des spores des actinomycètes	11
Figure 5	différents types de chaînes de spores exogènes rencontrées chez les actinomycètes	11
Figure 6	différents types de chaînes de spores endogènes rencontrées chez les actinomycètes	12
Figure 7	Structure des isomères de l'acide diaminopimélique	15
Figure 8	Structure chimique de l'acide mycolique	16
Figure 9	Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S	19
Figure 10	Distribution verticale des actinomycètes dans le sol (moyenne de trois échantillons de sol)	21
Figure 11	Distribution relative des souches productrices bioactifs parmi les actinomycètes rares	26
Figure 12	Structure de la vancomycine	28
Figure 13	Structure de la fosfomycine	28
Figure 14	Structure chimique de l'érythromycine A et exemples de modifications des substituants pour la synthèse de dérivés	29

Figure 15	Structure du Chloramphénicol (A) ; Structure du Thiamphénicol (B)	30
Figure 16	Squelette des tetracyclines	31
Figure 17	Amphotéricine B	35
Figure 18	Vue simplifiée de l'épidémiologie des résistances aux antibiotiques	39
Figure 19	Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques	42
Figure 20	différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative	44
Figure 21	Quadrillage de la cellule de Malassez	54
Figure 22	Protocole d'extraction des molécules bioactives à partir du culot	57
Figure 23	Protocole d'extraction des molécules bioactives à partir du surnageant	58
Figure 24	Aspect du mycélium végétatif et du mycélium aérien des souches d'actinomycètes sur milieu Bennett	61
Figure 25	Observation des souches S1, S2 et S3 (G× 1000) après coloration de Gram	62
Figure 26	Hydrolyse de l'amidon par les souches d'actinomycètes S1 et S3	64
Figure 27	Hydrolyse de la caséine par les souches actinomycétales S1, S2 et S3	64
Figure 28	Effet des trois souches d'actinomycètes S1, S2 et S3 sur le lait écrémé	65
Figure 29	Photos des tests d'activité antimicrobienne de la souche S1 vis-à-vis des souches tests : (A) <i>Aspergillus niger</i> ; (B) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 ; (C) <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif)	70

Figure 30	Photos des tests d'activité antimicrobienne de la souche S2 sur les souches tests : (A) <i>Escherichia coli</i> ; (B) <i>Escherichia coli</i> ATCC 25922 (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif)	71
Figure 31	Photos des tests d'activité antimicrobienne de la souche S3 vis-à-vis des souches tests : (A) <i>Aspergillus niger</i> ; (B) <i>Escherichia coli</i> (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif)	71
Figure 32	Photo de test d'activité antimicrobienne de la souche S3 vis-à-vis de la souche test : <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif)	72
Figure 33	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les souches d'actinomycètes (S1, S2 et S3)	72
Figure 34	Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> a la souche actinomycétale S1 (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif)	74
Figure 35	Résistance de <i>Candida albicans</i> aux trois souches d'actinomycètes (S1, S2 et S3) (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif)	75
Figure 36	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les différents extraits organiques de la souche S1	78
Figure 37	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les différents extraits organiques de la souche S2	78
Figure 38	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les différents extraits organiques de la souche S3	79
Figure 39	Effet de l'extrait chloroformique de la souche S1 sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme)	79
Figure 40	Résistance de <i>Klebsiella pneumoniae</i> à l'extrait chloroformique de la souche S1 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme)	79
Figure 41	Résistance d' <i>Escherichia coli</i> à l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S1 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle)	80

Figure 42	Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à l'extrait méthanolique de la souche S1 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatif réalisé avec le méthanol)	80
Figure 43	Effet de l'extrait chloroformique de la souche S2 sur <i>Escherichia coli</i> ATCC (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le chloroforme)	80
Figure 44	Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur <i>Escherichia coli</i> (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatif réalisés avec l'acétate d'éthyle)	81
Figure 45	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la souche S2 sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle)	81
Figure 46	Résistance de <i>Candida albicans</i> à l'extrait chloroformique de la souche S2 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme)	81
Figure 47	Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> à l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S2 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle)	82
Figure 48	Résistance d' <i>Aspergillus niger</i> à l'extrait méthanolique de la souche S2(T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le méthanol)	82
Figure 49	Effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur <i>Klebsiella pneumoniae</i> (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme)	83
Figure 50	Effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur <i>Staphylococcus aureus</i> (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme)	83
Figure 51	Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la souche S3 sur <i>Escherichia coli</i> ATCC (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle)	83
Figure 52	Effet de l'extrait méthanolique de la souche S3 sur <i>Aspergillus niger</i> (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif avec le méthanol)	84

Figure 53	Résistance de <i>Candida albicans</i> à l'extrait chloroformique de la souche S3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme)	84
Figure 54	Résistance de <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC à l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle)	84
Figure 55	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition(en mm) vis-à-vis des microorganismes-tests en fonction du pH et de la température (4°C), exprimées par les différents extraits organiques de la souche S2	89
Figure 56	Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition(en mm) vis-à-vis des microorganismes-tests en fonction du pH et de la température (4°C), exprimées par les différents extraits organiques de la souche S3	89
Figure 57	Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur <i>Escherichia coli</i> soumis à 4°C pendant 4 jours (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle)	90
Figure 58	Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dont le pH est ajusté à 3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle)	90
Figure 59	Absence d'Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur <i>Pseudomonas aeruginosa</i> dont le pH est ajusté à 11 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle)	90
Figure 60	Effet de l'extrait méthanolique de la souche S3 sur <i>Aspergillus niger</i> dont le pH est ajusté à 11 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le méthanol)	91
Figure 61	Effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur <i>Escherichia coli</i> ATCC dont le pH est ajusté à 11 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le chloroforme)	91
Figure 62	Absence d'effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur <i>Escherichia coli</i> ATCC dont le pH est ajusté à 3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le chloroforme)	91

INTRODUCTION

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques.

Les antibiotiques d'origine naturelle sont produits en majorité par les microorganismes. Une attention particulière est attribuée à ce groupe bactérien dans les applications biotechnologiques qui est un résultat cohérent de leur grande diversité métabolique. Ces derniers ont été la source de nombreuses molécules utilisées en thérapeutique humaine et animale (pénicilline, érythromycine, vancomycine, streptomycine, amphotéricine, etc.) et en agriculture (blastocidine S, kasugamycine, polyoxine D, validamycine, etc.) (MISATO, 1982 ; DUVAL et SOUSSY, 1990 ; MC MANUS *et al.*, 2002). Parmi les microorganismes, les actinomycètes sont les plus grands producteurs de molécules bioactives environ 70 % des antibiotiques découverts (SANGLIER *et al.*, 1993 ; SUZUKI *et al.*, 1994 ; TAKAHASHI et OMURA, 2003). Le genre *Streptomyces*, qui sécrète plus de 80 % de ces molécules, est très intensément exploité (BIEHAL, 2000 ; WATVE *et al.*, 2001). Les recherches actuelles de nouvelles molécules sont orientées vers des souches et des espèces nouvelles appartenant à d'autres genres et provenant d'écosystèmes extrêmes (pH, température, salinité, etc.). Parmi ces microorganismes rares, des actinomycètes autres que *Streptomyces*, se sont révélés être une source potentielle d'antibiotiques (SANGLIER *et al.*, 1996 ; LAZZARINI *et al.*, 2001 ; ELLAIAH *et al.*, 2002 ; GATHOGO *et al.*, 2004).

Dans la nature, ils jouent un grand rôle dans le recyclage des composés organiques (KUMAR *et al.*, 2012 ; SILVA *et al.*, 2013).

A l'heure actuelle, les problèmes de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients associé à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques, à fin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques.

La résistance microbienne aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent puisqu'elle a été évoquée peu après leur introduction en médecine humaine. En effet, depuis l'apparition des premiers agents anti-infectieux tels que les pénicillines et les sulfamides, les microorganismes n'ont pas cessé de s'adapter à l'environnement imposé par l'utilisation massive de ces substances (PLOY *et al.*, 2000 ; RUSSELL et MAILLARD, 2000 ; BLOOMFIELD, 2002 ;

LEVY, 2002 ; SCHWEIZER, 2003 ; ZERIZER *et al.*, 2006) et aujourd'hui nous sommes confrontés à une remontée croissante du nombre de souches microbiennes résistantes à tous les antibiotiques disponibles sur le marché; ces souches sont appelées multi-résistantes.

Face à cette situation, l'obtention de nouveaux antibiotiques (antibactériens et antifongiques) est devenue une nécessité.

Les travaux de recherche de ce mémoire s'inscrivent dans cette volonté de mettre en évidence de nouvelles molécules bioactives. Notre objectif est l'extraction et la caractérisation préliminaire de substances bioactives à partir de trois souches d'actinomycètes susceptibles de les produire.

SYNTHÈSE
BIBLIOGRAPHIQUE

CHAPITRE I
ACTINOMYCÈTES

1. Historique

L'histoire des actinomycètes peut être divisée en 5 grandes périodes. La première période qui va de 1877 à 1890 environ, a été nommée « période médicale » du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (BALDACCI, 1962).

La seconde période (1900-1940) (MARIAT ET SEBALD, 1990) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de ROSSI-DORIA (1891), GASPERINI (1892), KRAINSKY (1914), WAKSMAN (1919), LIESKE (1921), ORSKOV (1923), JENSEN (1932) et KRASSINIKOV (1938). Elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de WAKSMAN lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (LE MINOR, 1989 ; SANGLIER ET TRUJILLO, 1997). Cette période a résulté en un accroissement du nombre d'espèces décrites (BALDACCI, 1962).

Ainsi, la période suivante (1940-1970) peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries, de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques.

Enfin, dans le volume 5 du BERGEY'S MANUAL (2012) la classification des actinomycètes est basée principalement sur l'analyse de la séquence de l'ADNr 16S, alors, les actinomycètes sont classés dans le phylum des *Actinobacteria*, qui est arrangé en classes, ordres, familles, genres et espèces (WHITMAN *et al.*, 2012).

2. Caractères généraux

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, à coloration de Gram positive (NANJWAD *et al.*, 2010). Avec un coefficient de Chargaff (GC %) élevé, saprophytes, largement distribuées dans le sol, l'eau et les plantes montrant une diversité chimique et

morphologique marquée, mais forment une ligne distincte de l'évolution des organismes (GOODFELLOW et O'DONNELI, 1989).

Bien que les actinomycètes soient des microorganismes procaryotes, leur morphologie ressemble fortement à celle des micro-organismes eucaryotes comme les champignons filamenteux (OSADA, 1998). Les actinomycètes présentent des similitudes avec les eubactéries et les champignons. Il existe des formes de transition, mycéliennes typiques et unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. Le diamètre des filaments des formes mycéliennes est toutefois environ deux fois plus faible que celui des champignons.

La plupart des actinomycètes sont terrestres, certaines espèces sont marines (MINCER *et al.*, 2002). Les actinomycètes sont répandus dans l'environnement et la plupart des espèces sont aérobies, mésophiles, leur température optimale est de 25-30 °C et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (WILLIAMS et WELLINGTON, 1982 ; GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983 ; GUIRAUD, 1998). La plupart d'entre eux sont toujours immobiles, leur croissance est lente avec un temps de génération de 2 à 3 heures, ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines (LARPENT et SANGLIER, 1989).

Les facteurs importants contrôlant l'abondance et l'activité des actinomycètes dans le sol sont : la disponibilité des nutriments, la nature et l'abondance de la matière organique, la salinité, la teneur en humidité relative, la température, le pH et la végétation du sol (GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983).

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes et sont rattachés à l'Ordre des *Actinomycétales* créé par BUCHANAN en 1917. Plusieurs réévaluations systématiques récentes de l'ordre reflètent l'intégration de données moléculaires notamment la séquence du gène ARNr 16s.

Actuellement, le phylum Actinobacteria tel qu'il figure dans le BERGEY'S MANUAL (2012) renferme une seule classe : Actinobacteria, cette classe est subdivisée en 5 sous-classe, 6 ordres, 13 sous-ordre (dont 9 appartiennent à l'ordre des Actinomycétales), 41 familles, 193 genres et près de 1711 espèces.

Tous les membres de cet ordre sont caractérisés par leur grande teneur en G+C %, allant de 51 % chez certaines Corynebactéries, à plus de 70 % chez les genres *Streptomyces* et *Frankia*, (VENTURA *et al.*, 2007) et présentent une grande différenciation quant au développement de leur cycle de vie.

L'ordre des *Actinomycétales* comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant de la forme cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*) et ceux qui possèdent un mycélium persistant et bien différencié (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*, *etc.*) (OSKAY *et al.*, 2004 ; SRIVIBOOL et SUKCHOTIRATANA, 2006).

Les Streptomycètes représentent l'un des taxa appartenant à l'ordre des Actinomycétales qui renferment une diversité de morphotypes, comprenant des formes unicellulaires sphériques, des hyphes fragmentés et des mycéliums ramifiés. En effet, la famille *Streptomycetaceae* comprend 10 genres : *Streptoverticillium*, *Streptacidiphilus*, *Microellobosporia*, *Kitasatospora*, *Kitasatoa*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Actinosporangium*, *Actinopycnidium* et *Streptomyces* et plus d'une centaine d'espèces. Cependant, les genres *Actinosporangium*, *Actinopycnidium*, *Elytrosporangium*, *Chainia*, *Microellobosporia* et *Kitasatoa*, suite à l'utilisation de méthodes de biologie moléculaire, notamment, le séquençage de l'ADNr 16s, ils ont été assimilés au genre *Streptomyces* (BERGEY'S MANUAL, 2012).

3. Vue générale du métabolisme

Au cours de leur croissance, les actinomycètes peuvent passer d'un métabolisme dit primaire (trophophase) à un métabolisme dit secondaire (idiophase). Au cours de ces deux phases, des métabolites sont synthétisés. Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés. Elles sont résumées dans le Tableau I (DLAUNAY *et al.*, 2003).

Parmi les nombreux métabolites secondaires produits par les actinomycètes figurent les antibiotiques. Cette production a été au départ en milieu solide et se manifeste par la présence d'une zone d'inhibition de croissance des espèces sensibles autour des colonies d'actinomycètes, due à la diffusion de l'antibiotique dans le milieu gélosé. (DLAUNAY *et al.*, 2003).

Tableau I : Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires
(DLAUNAY *et al.*, 2003).

Métabolites primaires	Métabolites secondaires
Synthétisé pendant la trophophase	Synthèse pendant l'idiophase
Présent tout au long du cycle cellulaire	Apparition à un moment du cycle cellulaire
Nécessaire à la croissance	Inutile pour la croissance
Rôle physiologique connu	Rôle physiologique mal connu
« turn-over » élevé	« turn-over » pratiquement nul
Produit dans des conditions de culture diverses	Produit dans des conditions de culture bien définies
Voie de synthèse simple et courte	Synthèse longue et complexe
Synthèse d'un produit parfaitement défini	Synthèse d'un mélange de produits
Structure chimique généralement simple	Structure chimique souvent complexe
Concentration élevée	Concentration faible

Deux propriétés les plus significatives des actinomycètes sont leur capacité à se développer sur les substrats les plus divers et leur aptitude à synthétiser de très nombreux métabolites bioactifs parmi lesquels on compte les deux tiers des antibiotiques produits par des micro-organismes. Ces propriétés traduisent la richesse tout à fait remarquable du métabolisme cellulaire de ce groupe microbien (THEILLEUX, 1993).

Les actinomycètes sont généralement hétérotrophes, chimioorganotrophes, certains étant chimioautotrophes, ils peuvent utiliser une grande variété de substances comme sources de carbone et d'azote tels la chitine, la kératine, la cellulose, le xylane, le plastique, le nitrate, les polluants pétroliers comme le benzène, polychloro-biphényle, la gélatine, le xylénol, la caséine, l'urée, les pesticides comme l'atrazine (MARIAT et SEBALD, 1990 ; KORKMAZ *et al.*, 2003 ; KANG et KONDO, 2004 ; OULMI, 2004 ; PELMONT, 2005 ; KITOUNI, 2007 ; JARADAT *et al.*, 2008 ; HERNANDEZ *et al.*, 2008 ; KHAN *et al.*, 2008 ; ZERMAN, 2008 ; MANE *et al.*, 2009 ; ABOUL-ENEIN *et al.*, 2010).

4. Culture et morphologie des actinomycètes

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes (PRESCOTT *et al.*, 2010). Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1 μm (EUNICE et PROSSER, 1983), est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 μm) (GOTTLIEB, 1973).

Sur les milieux solides, les actinomycètes forment des colonies de forme et d'aspect très particulier (OTTOW et GLATHE, 1968 ; LARPENT et SANGLIER, 1989). Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm. L'aspect des colonies peut être compact, sec, lisse, rugueux, poudreux, ou en chou-fleur à contours lisses ou échancrés. Les colonies sont souvent pigmentées (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc.) (PERRY *et al.*, 2004).

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). La figure ci-dessous montre le cycle de développement de ce genre sur milieu solide.

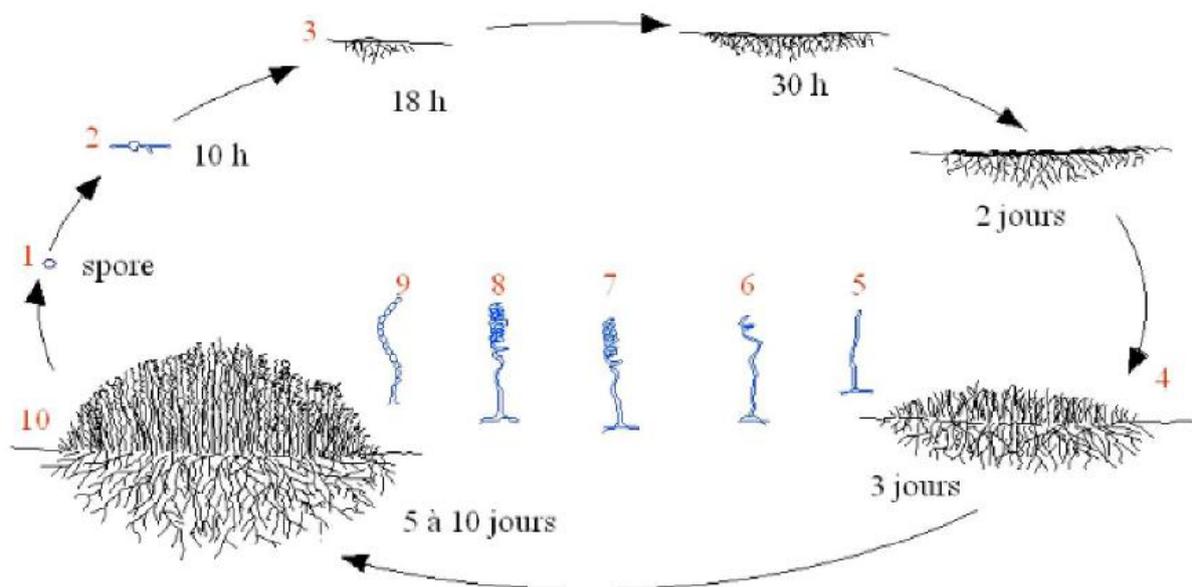


Figure 1: Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide. 1 : spore, 2 : tube germinal, 3 : mycélium végétatif, 4 : jeune colonie, 5 : mycélium aérien, 6 : sporophore, 7 : sporulation, 8 et 9 : maturation des spores, 10 : colonie mature (HOPWOOD *et al.*, 1985).

En milieux liquides sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (KEULEN *et al.*, 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les actinomycètes forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'entremêlent pour former des agrégats. Ces, derniers, généralement sphériques sont composés d'une masse dense d'hyphes enroulés (figure 2).

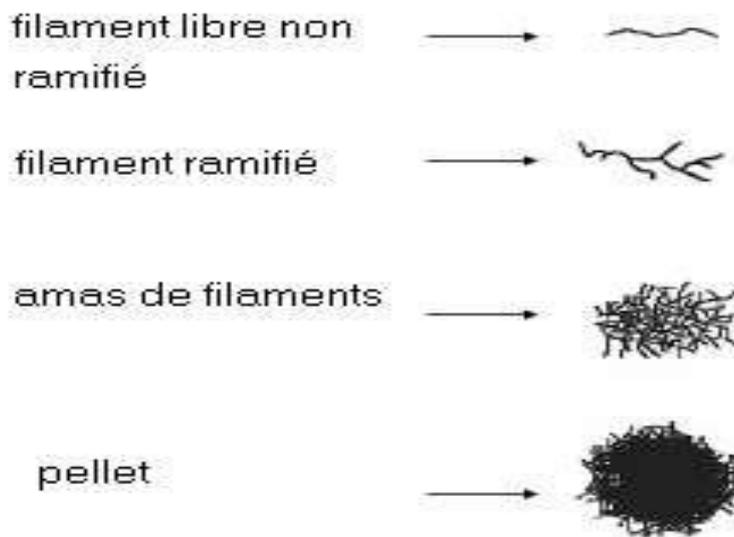


Figure 2: les classes morphologiques d'actinomycètes cultivées en milieu liquide (PAMBOUKIAN *et al.*, 2002).

4.1. Le Mycélium

4.1.1. Mycélium primaire

Le mycélium persistant peut être organisé à son tour en mycélium de substrat (aussi appelé mycélium végétatif, mycélium de base, mycélium primaire ou encore mycélium intramatriciel) et/ou en mycélium aérien (aussi appelé mycélium secondaire).

Le mycélium de substrat se présente sous la forme d'un ensemble de filaments multinucléaires formés à partir du tube germinal (hyphe) issu d'une spore. Cet hyphe s'allonge par croissance apicale et se ramifie à maintes reprises. Son développement, sur la surface et à l'intérieur du milieu solide, donne naissance à des jeunes colonies, formées par des filaments attachés en matrice complexe (MIGUELEZ *et al.*, 2000).

4.1.2. Mycélium secondaire

Le mycélium aérien se forme lorsque la colonie devient plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Contrairement à celui du substrat, le mycélium aérien est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur milieu pauvre en sources nutritionnelles, dans la plupart des cas, par la dégradation du mycélium de substrat dont les produits assurent un apport relativement constant en nutriments pour sa croissance loin de la colonie (MIGUELEZ *et al.*, 2000 ; PRESCOTT *et al.*, 2003).

En fonction du genre, les mycéliums (végétatif et aérien) des actinomycètes peuvent se former selon trois schémas bien distincts :

- Soit seul le mycélium végétatif est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*) ;
- Soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûri en conidies (*Streptomyces*) ;
- Soit seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Spirichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachés au substrat par des crampons (DJABALLAH, 2010). La figure 3 illustre le mycélium aérien et végétatif d'une colonie d'actinomycète.

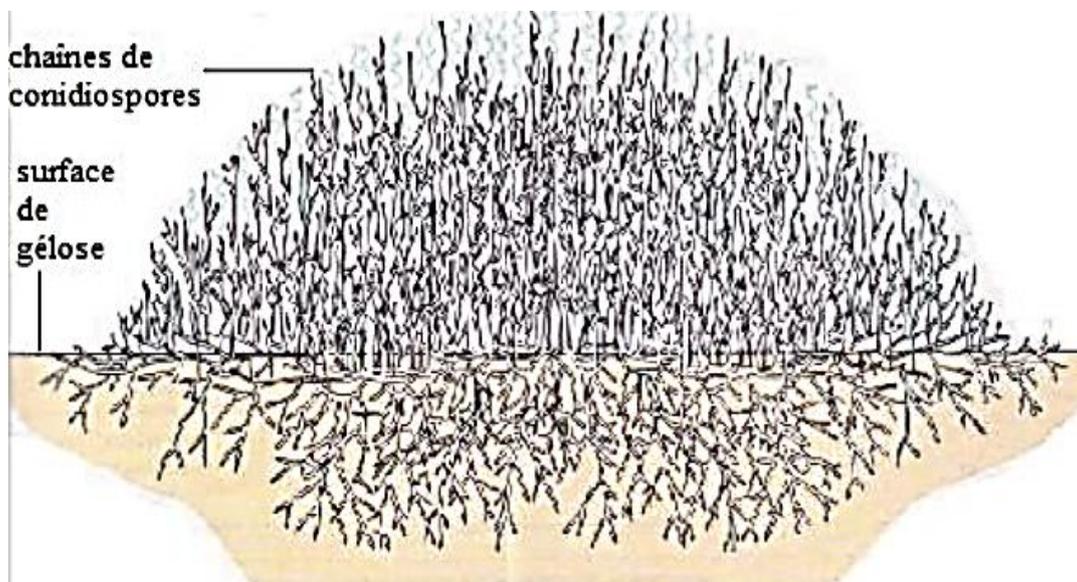


Figure 3: Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète montrant le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores (PRESCOTT *et al.*, 2003).

4.2. La formation des spores

Les hyphes aériens des actinomycètes subissent une série de changements développementaux qui donneront naissance aux spores. On distingue deux types de spores selon leur mode de formation : les exospores et les endospores, également appelées conidies (THEILLEUX, 1993), celles-ci permettent la propagation de l'espèce et la survie dans de conditions défavorables (SAFFROY, 2006).

4.2.1. Les exospores

Les actinomycètes forment généralement des exospores qui peuvent avoir des formes très variables. Elles se développent par septation des extrémités du filament, habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs. La plupart ne sont pas particulièrement résistantes à la chaleur, mais supportent bien la dessiccation et ont, de ce fait, une importante valeur adaptative (PRESCOTT *et al.*, 2007). Les différents types de chaînes de spores exogènes rencontrées chez les actinomycètes sont représentés dans la figure 5.

4.2.2. Les endospores

Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles. Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphé.

Tout comme les endospores bactériennes du genre *Bacillus* (une bactérie à coloration de Gram positive qui a des spores très résistantes à la chaleur), les spores des *Thermoactinomyces* contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6.5 à 7 % (poids/poids), ce qui est inférieur à la concentration retrouvée dans les spores de *Bacillus*. Cet acide, probablement situé dans la partie centrale de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur. Les endospores des thermoactinmycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (SYKES et SKINNER, 1973 ; KITOUNI, 2007). Les différents types de chaînes de spores endogènes sont représentés dans la figure 6.

Les spores d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements. Celles-ci peuvent être produites isolément, deux à deux longitudinalement, en courtes chaînettes, en longues chaînettes. Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. On rencontre

également une importante diversité au niveau de la surface des spores : lisse, ridée ou d'aspect velu. Chez certains genres, les spores sont contenues dans un sporange : compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore. Les sporanges contiennent de quelques à plusieurs milliers de spores, formant des chaînes enroulées ou parallèles. La plupart des actinomycètes sont immobiles ; cependant, chez certains genres il est possible de trouver des spores dotées de flagelles (zoospores), ceci permet leur dispersion dans les habitats aquatiques (figure 4).

Position des flagelles sur les spores mobiles

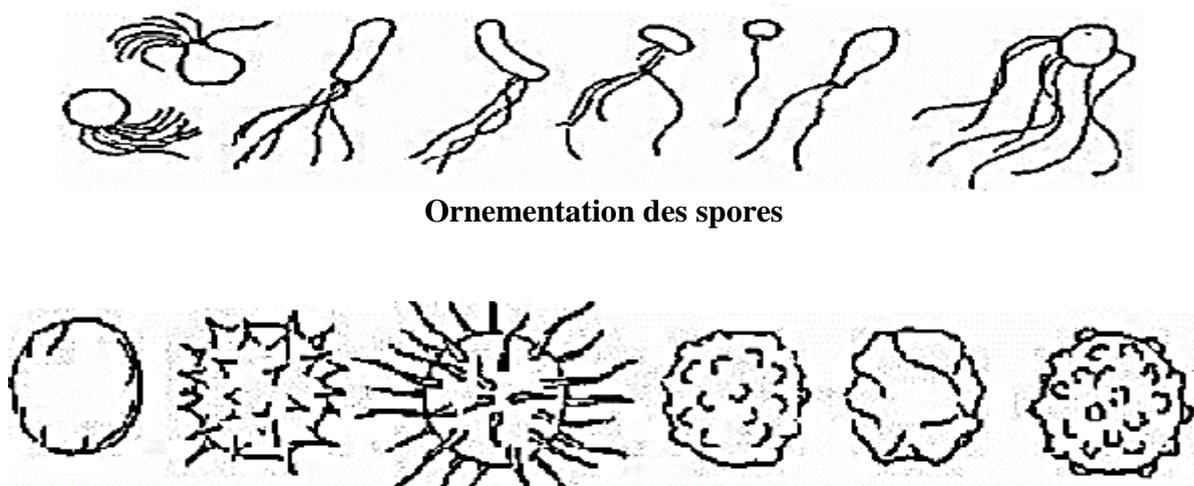


Figure 4 : Morphologie des spores des actinomycètes (ERRAKHI, 2008).

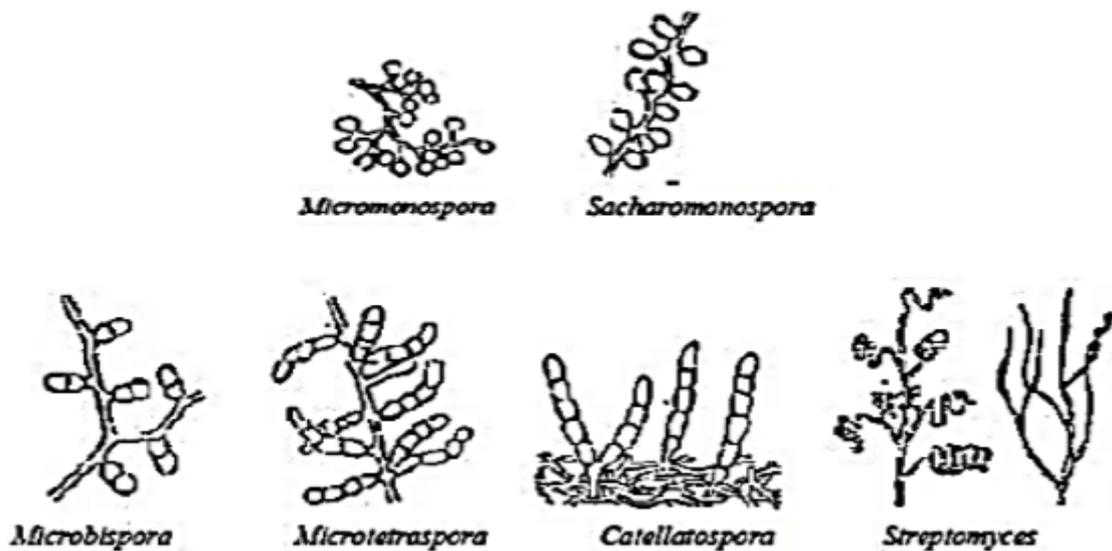


Figure 5 : différents types de chaînes de spores exogènes rencontrées chez les actinomycètes (ERRAKHI, 2008).

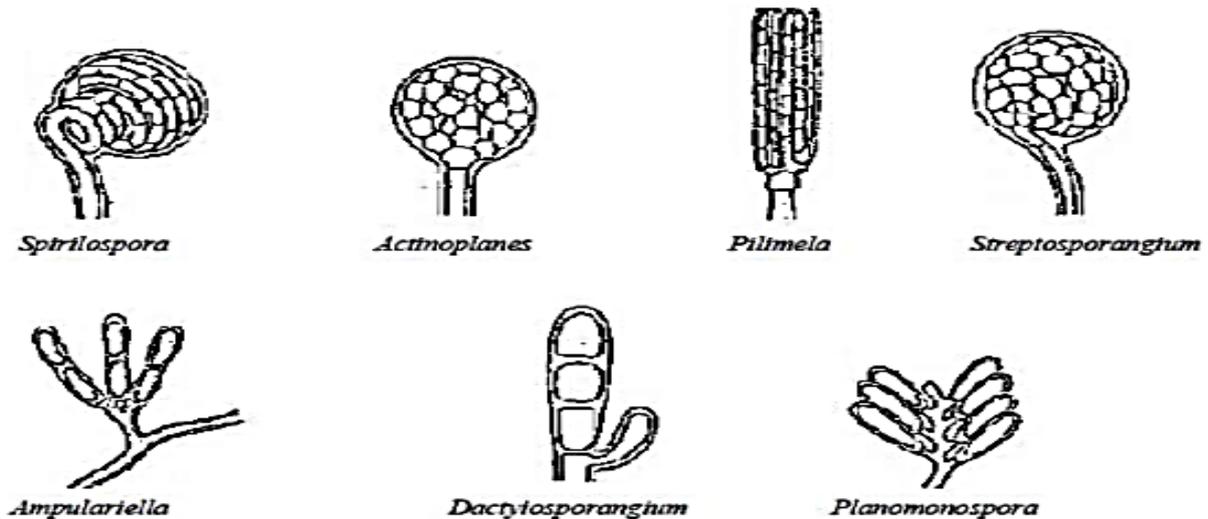


Figure 6 : différents types de chaînes de spores endogènes rencontrées chez les actinomycètes (ERRAKHI, 2008).

5. Taxonomie et critères d'identification

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 (HOLT *et al.*, 2000).

L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le manuel Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties dédiées aux Actinobacteria (BERGEY'S MANUAL, 2012).

5.1. Critères culturels et macromorphologiques

D'après NOUREDINE, (2006) et BOUDJELLA *et al.*, (2007), les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinomycètes entre eux.

Parmi les caractères culturels importants :

- La production d'un mycélium aérien (MA) (cas de nombreux genres) ou non (ex *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus* ;
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS) ;
- La couleur du MA et du MS. La couleur exacte peut être définie à l'aide d'une carte de couleur ;

- La production et la couleur des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

5.2.Critères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques importants selon NOUREDINE, (2006) et BOUDJELLA, *et al.*, (2007) sont :

- La fragmentation ou non du MS ;
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes) ; la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue) ;
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores ;
- La présence de spores mobiles (ex. : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ou non mobiles (ex. : *Streptomyces*, *Streptosporangium*, *Micromonospora*, ainsi que de nombreux autres genres...) ;
- La formation d'endospores (*Thermoactinomyces*) ou la présence de structures particulières comme les sporanges (DEMAIN et SOLOMON, 1986).

Mais bien qu'il soit parfois possible de classer une souche sur la base de critères morphologiques tout à fait évidents, ceux-ci ne suffisent pas pour établir une détermination correcte et il est indispensable de considérer d'autres caractères (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1980).

5.3.Critères chimio-taxonomiques

Des études rapportées par BECKER *et al.*, (1965) ont établi que les actinomycètes avaient une paroi cellulaire de composition très proche de celle des bactéries à Gram positif.

La composition en acides aminés, en glucides et en lipides constitue la principale caractéristique utilisée en chimiotaxonomie (STANEK et ROBERTS, 1974 ; LECHEVALIER *et al.*, 1977).

5.3.1. Les sucres

Les sucres ayant une importance taxonomique sont l'arabinose, le galactose, le xylose et le madurose. L'analyse des glucides peut se faire directement à partir d'hydrolysats cellulaires à l'aide d'une chromatographie en couche mince, suivie d'une révélation chimique (Tableau II)

Tableau II: Sucres cellulaires totaux des actinomycètes (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1970).

Profils de sucres	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
A	Arabinose, Galactose	<i>Nocardia, Rhodococcus, Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura, Streptosporangium, Demaphilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora, Actinosynnema, Geodermatophilus</i>
D	Arabinose, Xylose	<i>Micromonospora, Actinoplanes</i>

Cependant, la paroi de certains actinomycètes peut contenir d'autres sucres tels que le fucose qui rentre dans la composition de la paroi de certaines espèces appartenant aux genres *Frankia* et *Actinoplanes* ; le rhamnose avec le galactose peuvent orienter le diagnostic d'identification vers certaines espèces appartenant au genre *Saccharothrix* ; le mannose avec le rhamnose et le galactose caractérisant quant à eux le genre *Streptoalloteichus* (PRESCOTT *et al.*, 2003).

5.3.2. Les acides aminés

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée d'un peptidoglycane dont les chaînes peptidiques sont composées d'acides aminés très diverses. Certains ont une grande valeur taxonomique, ces derniers sont donc la lysine, l'acide 2.6-diaminopimélique (DAP) qui peut être sous la forme isomérique LL ou DL (méso) (figure 7), l'acide 2.4-diaminobutyrique et la glycine. La combinaison du type d'acide aminé du peptidoglycane et du spectre de glucides permet un classement en 8 groupes principaux (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1970).

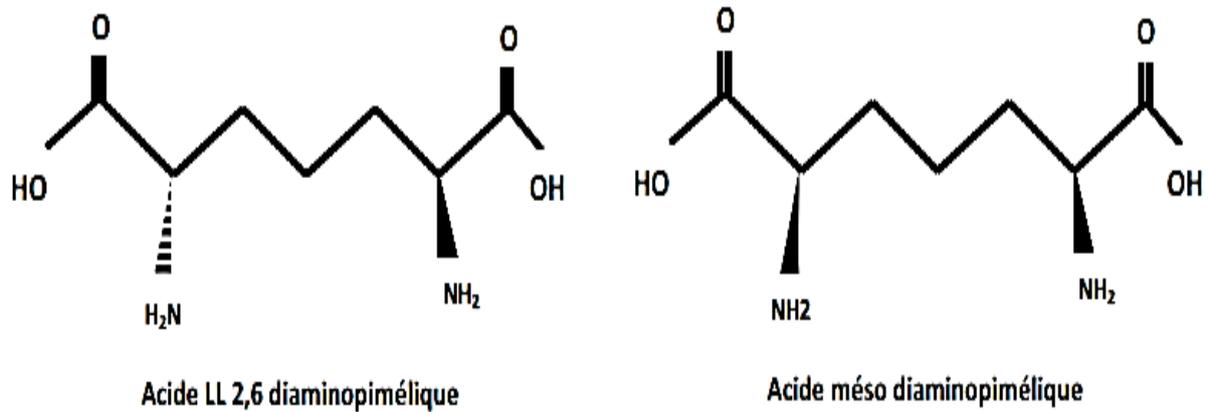


Figure 7 : Structure des isomères de l'acide diaminopimélique (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1970).

Tableau III : Types de parois des actinomycètes en fonction des constituants en acides aminés et en sucres (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1970).

Type de paroi	Constituants majeurs	Exemples de genres
I	LL-DAP	<i>Streptomyces</i>
II	Méso-DAP, Glycine, Xylose, Arabinose	<i>Micromonospora</i>
III	Méso-DAP, Maduroseose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, Arabinose, Galactose	<i>Actinomaces israelii</i>
V	Lysine, Ornithine	<i>Nocardia</i>
VI	Lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, Glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	Ornithine	<i>Cellulomonas</i>

DAP : Acide 2.6-diaminopimélique ; DAB : Acide 2.4-diaminobutirique.

5.3.3. Les lipides

Les lipides taxonomiquement important peuvent être représentés par quatre groupes : les lipides polaires, les ménaquinones, les acides mycoliques et les acides gras.

5.3.3.1. Les lipides polaires

Les lipides polaires les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides. L'analyse de ces composés a permis de distinguer entre plusieurs genres ayant le même profil morphologique ainsi que le même type pariétal (MINNIKIN et GOODFELLOW, 1981) tel que *Pseudonocardia* et *Amicolatopsis* (LECHEVALIER *et al.*, 1986), *Nocardiosis* et *Saccharothrix* (LABEDA *et al.*, 1984).

5.3.3.2. Les ménaquinones

Les ménaquinones sont des lipides présents au niveau de la membrane plasmique et jouent un rôle dans le transport des électrons et dans la phosphorylation oxydative. Ils possèdent dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (COLLIN *et al.*, 1980).

5.3.3.3. Les acides mycoliques

Ce sont des composés pariétaux constitués de 20 à 90 carbones, présents uniquement chez certains genres tels que *Mycobacterium* (80 carbones), *Nocardia* (50 C) et *Corynebacterium* (30 C). Ils sont donc utiles pour différencier certains genres de ce type entre eux, par leur présence ou leur absence (MORDARSKA *et al.*, 1972). Leur structure générale est la suivante :

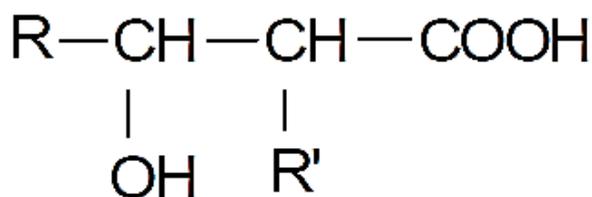


Figure 8 : Structure chimique de l'acide mycolique (ZITOUNI, 2005).

5.3.3.4. Les acides gras

Ce sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Le nombre d'atomes de carbone est caractéristique du genre (KROPPESTEDT *et al.*, 1990 ; MINNIKIN et GOODFELLOW, 1981).

5.4. Critères physiologiques

Les tests physiologiques utilisés consistent en des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc.), des tests de résistance aux différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents), ainsi que la tolérance au pH, à la température, à la salinité, etc.

5.5. Critères moléculaires

Les principales analyses moléculaires utilisées dans la taxonomie des actinomycètes pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ARN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN, et la détermination du coefficient de Chargaff (G+C %).

5.5.1. Coefficient de Chargaff

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. Au-delà de 70 % de similitude, deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce.

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 (LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1985).

Tableau IV : Valeur du coefficient de Chargaff pour les différents genres d'actinomycétales (JACQUE, 1985).

Genre	GC%
<i>Mycobacterium</i>	64 à 70
<i>Actinomyces</i>	63 à 73
<i>Nocardia</i>	67 à 69,4
<i>Streptomyces</i>	69 à 76
<i>Micromonospora</i>	71,4 à 72,8
<i>Actinoplanes</i>	70,6 à 76

5.5.2. Séquençage de l'ADN ribosomique 16S

C'est une technique très fiable pour l'identification des actinomycètes (WEISBURG et *al.*, 1991 ; COOK et MEYERS, 2003).

STACKEBRANDT et ces collaborateurs 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 (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage.

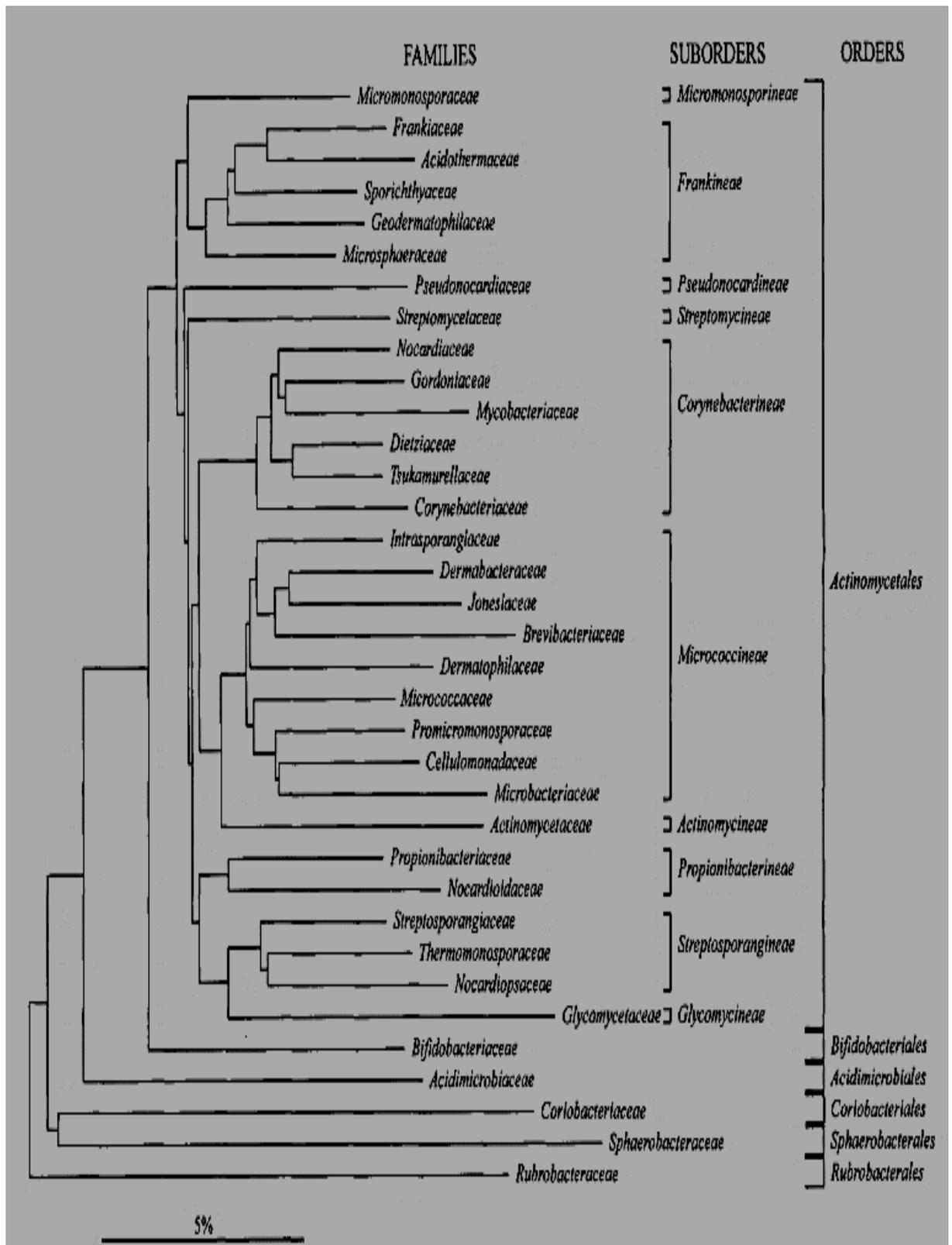


Figure 9 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (ZHI, 2009).

6. Ecologie et distribution des actinomycètes dans la nature

La grande diversité métabolique leur permet d’avoir une importance écologique majeure dans l’environnement (HASLEY et LECLERC, 1993). Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires, que l’on rencontre sur tous les substrats naturels courants (voir tableau V). Dans le sol, les actinomycètes représentent 10 à 20 % de la population microbienne totale (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970 ; TAKAHASHI et OMURA, 2003).

Tableau V : Répartition des actinomycètes dans la nature (GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983).

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodule de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine généralement dans les sols et divers autres substrats. Il représente 80 à 95 % du total des actinomycètes (LACEY, 1973 ; ELWAN et AL-GOUNAIM, 1985). Après *Streptomyces*, les genres les plus fréquents sont *Nocardia* et *Micromonospora* (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970). Les autres genres ne constituent qu’une fraction minimale et sont parfois peu fréquents ou même assez rares.

La plupart des Actinomycètes sont saprophytes, mais quelques-uns peuvent être pathogènes ou symbiotes des plantes et des animaux (SUZUKI *et al.*, 1994).

Les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à climat aride, se sont révélés riches en actinomycètes parfois réputés rares de par le monde (BOUDEMAGH, 2007). On les trouve non seulement dans les horizons de surface, mais aussi à plus de 2 mètres de profondeur et en quantité appréciable (SABAOU *et al.*, 1998). La figure 10 illustre leur distribution en surface et en profondeur.

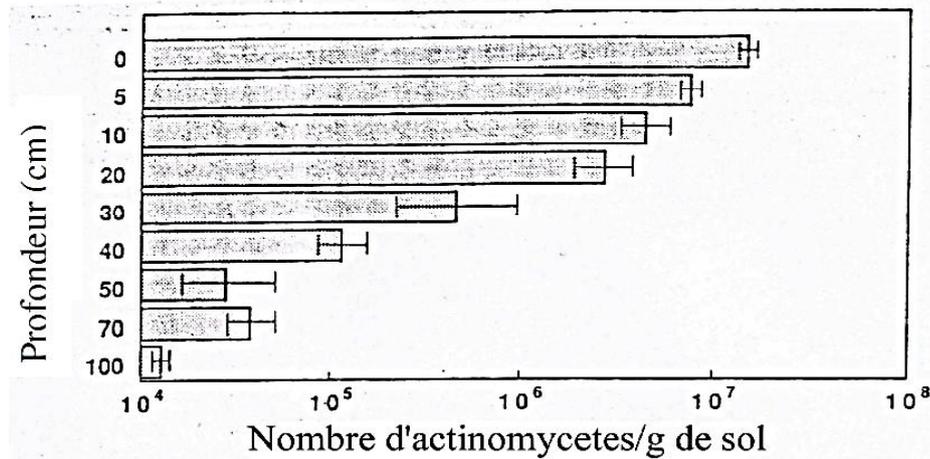


Figure 10 : Distribution verticale des actinomycètes dans le sol (moyenne de trois échantillons de sol) (IWAI et TAKASHI, 1992).

Des actinomycètes ont été isolés à partir d'habitat varié, tels que les rhizosphères des plantes médicinales (KHAMNA *et al.*, 2010), de l'écorce d'arbres (PULLEN *et al.*, 2002 ; KITOUNI *et al.*, 2005), des sédiments marins (BALAGURUNTHA *et al.*, 2010). Certaines espèces ont, en outre, été isolées à partir de milieux extrêmes : des sols pollués contenant des métaux (DESJARDIN, 2002), des hydrocarbures ou du pétrole (BANIASADI *et al.*, 2009), les boues activées (SIMON et MEUNIER, 1970), d'autres se comportent comme des parasites intracellulaires des spongiaires (GRANDHIMATHI *et al.*, 2007).

7. Les Actinomycètes en biotechnologie

L'hétérogénéité biochimique des actinomycètes, leur diversité écologique et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreux composés intéressants en industrie pharmaceutique et alimentaire, médicale et environnementale (MINCER *et al.*, 2002; BEHAL, 2003 ; OVERBYE et BARRETT, 2005 ; ABBAS, 2006 ; BALTZ, 2008) comme les antibiotiques, les pesticides (antimycine A), les herbicides (phinotricine), les insecticides (mikkomycine), les antiparasites et des enzymes. Parmi ces composés, les antibiotiques tiennent une place importante en nombre et en importance thérapeutique et commerciale (OSKAY *et al.*, 2004).

Les actinomycètes gagnent en importance, car c'est la plus importante source de production d'antibiotiques et autres métabolites secondaires bioactifs (VALAN ARAZU *et al.*, 2009), ce qui fait d'eux des producteurs intéressants en industrie pharmaceutique.

En effet, ils sont à l'origine de 70 % des antibiotiques naturels connus dans le monde (ZERIZER *et al.*, 2006). Les *Streptomyces* sont particulièrement prolifiques (OSKAY *et al.*, 2004). Ainsi, 80 % des antibiotiques commercialisés proviennent de ce genre (THAKUR *et al.*, 2007), à savoir : la streptomycine, la novobiocine, la nystatine, etc. D'autres genres producteurs peuvent être cités : *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Nocardiosis*, et *Saccharothrix*.

En ce qui concerne l'activité antifongique des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux, mais s'étend aux levures et aux dermatophytes.

A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (SANASAM et NINGTHOUJAM, 2010), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité antidermatophytique vis-à-vis du dermatophyte *Trichophytum rubrum* (LAKSHMIPATHY et KRISHNAN, 2009).

Tableau VI : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.

Actinomycètes producteurs	Antibiotiques	Références
1/ Les agents antibactériens		
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostomycine	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	Candidine	JINENEZ <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolidigine	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	INOUE <i>et al.</i> , 2007
<i>Marinispora sp.</i>	Marinomycine	STURDIKOVA et STURDIK, 2009
<i>Verrucispora sp.</i>	Abyssomycine	STURDIKOVA et STURDIK, 2009
2/ Les agents antifongiques		
<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>	Transvalencine	MUKAI <i>et al.</i> , 2006
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B	CARLE <i>et al.</i> , 2003
3/ Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes		
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Spinosad. Insecticide neurotoxique	WILLIAMSON <i>et al.</i> , 2006
<i>Actinomadura sp</i>	Herbicides. Exemple 1. 2,4-Dihydro-4-(β -D-ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one	SCHMITZER <i>et al.</i> , 2000
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Exemple 2. herbimycine	OMURA <i>et la.</i> , 2006

Les actinomycètes sont aussi une grande source de molécules possédant des activités biologiques variées telles que des agents antitumoraux comme la montanastatine produite par *Streptomyces anulatus*, la mitomycine de *Streptomyces lavendulae* et les bléomycines de *Streptomyces verticillus* (PETIT *et al.*, 1999), des antiviraux tels que les rifampycines, produits de fermentation de *Streptomyces mediterranei*, ont montré des propriétés antivirales contre des bactériophages, mais aussi des virus mammifères (WEHRLI et STAEHELIN, 1971), l'actinohivine est un autre exemple de substances bioactives produites par les actinomycètes ; c'est une nouvelle protéine anti-VIH isolée à partir de la souche K97-0003 et qui a la capacité d'inhiber la formation du syncytium (CHIBA *et al.*, 2001). Ainsi, des inhibiteurs d'enzymes, des vitamines, des immunomodulateurs (BADJI, 2006), ou des antiparasitaires (OSKAY *et al.*, 2004). Quelques exemples de ces molécules bioactives sont illustrés dans le tableau VII.

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinomycètes (LOPES *et al.*, 1999), tels que les enzymes alcalines (LI *et al.*, 2005), les transglutaminases, les xylanases et cellulases utilisées dans le traitement des sous-produits (RAWASHDEH *et al.*, 2005), de multiples protéases (RIFAAT *et al.*, 2007 ; VONOTHINI *et al.*, 2008) qui peuvent ensuite trouver des applications dans l'industrie des détergents par exemple (MOREIRA *et al.*, 2002).

Les enzymes isolées à partir des actinomycètes des environnements extrêmes, dites actinomycètes extrémophiles, sont commercialement très importantes. Quelques exemples d'extrêmozymes produites par les actinomycètes extrémophiles sont résumés dans le tableau VIII.

Tableau VII : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes.

Molécules bioactives	Actinomycète producteur	Références
1/ Les agents antiparasitaires		
Trioxacarcine	<i>Streptomyces</i> sp	MASKEY <i>et al.</i> , 2004
Prodiginine	<i>Streptomyces coelicolor</i>	WILLIAMSON <i>et al.</i> , 2006
2/ Les agents antiviraux		
9-β-D-Arabinofuranosyladénine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	MADIGAN <i>et al.</i> , 1997
Panosialine	<i>Streptomyces</i> sp	AOYAGI <i>et al.</i> , 2006
3/ Les agents antitumoraux		
Asterobactine	<i>Nocardia asteroides</i>	NEMOTO <i>et al.</i> , 2002
Mechercharmycine	<i>Thermoactinomyces</i> sp	KANOHI <i>et al.</i> , 2005
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	FENICAL <i>et al.</i> , 2006
Marinomycine	<i>Marinospora</i> sp	KWON <i>et al.</i> , 2006
Borrelidine	<i>Streptomyces</i> sp	VINO et LOKESH, 2008
IB-00208	<i>Actinomadura</i> sp	MALET-GASON <i>et al.</i> , 2009
4/ Les agents immunostimulateurs		
Rubratin	<i>Nocardia rubra</i>	DEBOER <i>et al.</i> , 2000
Bestatine	<i>Streptomyces olivorticuli</i>	IKINOSE <i>et al.</i> , 2003
FR-900494	<i>Kitastosporia kifunense</i>	IWAMI <i>et al.</i> , 2006
5/ Les agents immunosuppresseurs		
Pentalenolactone	<i>Streptomyces filipinensis</i>	UYEDA <i>et al.</i> , 2001
Brasilicardine A	<i>Nocardia brasiliensis</i>	KOMATSU <i>et al.</i> , 2005
6/ Les enzymes a application thérapeutique (antitumorale)		
L-asparaginase	<i>Streptomyces</i> sp	SALEEM BASHA <i>et al.</i> , 2009
L-glutaminase	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	BALAGURUNATHA <i>et al.</i> , 2010

Tableau VIII : Quelques exemples d'extrêmomyces produites par les actinomycètes.

Actinomycetes extremophiles	Extremozymes	T _{opt}	pH _{opt}	Références
1/ Actinomycètes Alkalithermophiles				
<i>Thermomonospora sp</i>	Endocellulase	50 °C	5	GEORGE <i>et al.</i> , 2001
		Stabilité à pH = [7 – 10] t _{1/2} vie : 3 heures à 70 °C		
<i>Streptomyces anulatus</i>	Dextranase	50 °C	8	DECKER <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces sp</i>	Endocellulase	50 °C	8	VAN SOULINGER <i>et al.</i> , 2001
<i>Streptomyces sp</i>	Kératinase	50 °C	8,5	KORKMAZ <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces sp</i>	Cellulase	60 °C	8	ABOUL-ENEIN <i>et al.</i> , 2010
2/ Actinomycète thermophile				
<i>Streptomyces sp</i>	Xylanase	60 °C	6,5	RAWASHDEH <i>et al.</i> , 2005
<i>Streptomyces sp</i>	Glucose isomérase	70 °C	6,9	DHUNGEL <i>et al.</i> , 2007
3/ Actinomycète alcaliphile				
<i>Streptomyces fradiae</i>	Aminopéptidase		10	VITALE, 1999
4/ Actinomycète halo-alkaliphile		[NaCl]	pH _{opt}	
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Protéase	5 %	9	THUMAR et SINGH, 2007
5/ Actinomycète psychrotrophe		T _{opt}	Stabilité thermique de l'enzyme	
<i>Streptomyces sp</i>	Alpha-amylase	15 °C	T= [5 – 20] °C	COTARLET <i>et al.</i> , 2010

Cependant, depuis ces dernières années, les chercheurs se sont intéressés à la recherche d'actinomycètes rares (autre que les *Streptomyces sp.*) dans le but de trouver de nouvelles molécules bioactives. Par exemple, les Actinoplanètes (HAYAKAWA *et al.*, 2004), *Kitasatospora sp.* (TAKAHASHI et OMURA, 2003), *Sacharotrix sp.* (ZITOUNI *et al.*, 2005), la figure 11 illustre la distribution relative des souches d'actinomycètes rares.

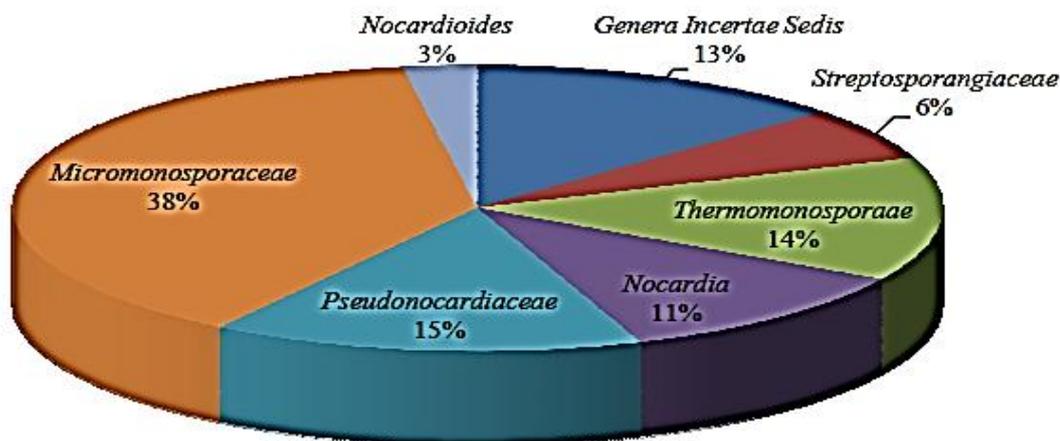


Figure 11 : Distribution relative des souches productrices bioactives parmi les actinomycètes rares (LAZZARINI *et al.*, 2001).

Les actinomycètes sont une source particulièrement riche de métabolites secondaires (BERDY, 2012). En effet, les actinomycètes produisent 47 % des molécules bioactives issues de microorganismes, découvertes entre 1940 et 2010 parmi lesquelles 24 % sont issues d'actinomycètes rares (tableau IX).

Tableau IX : Nombre approximatif de métabolites bioactifs découverts entre 1940 et 2010 en fonction des microorganismes producteurs, d'après (BERDY, 2012).

Période / Microorganisme	1940-1974		1975-2000		2001-2010		Total	
	Actinomycètes :							
Streptomyces	3400	66,0%	7200	48,3%	3100	34,1%	13700	47,0%
Actinomycetes rares	2900		5100		2400		10400	
	500		2100		700		3300	
Bactéries (autres) :								
Myxobactérie	800	15,5%	2300	15,5%	1100	12,1 %	4200	14,4%
cyanobactérie	25		400		210		635	
	10		30		125		165	
Champiignons microscopique	950	18,5%	5400	36,2%	4900	53,8%	11250	38,6%
Total	5150		14900		9100		29150	

CHAPITRE II
LES ANTIBIOTIQUES
ET ANTIFONGIQUES
PRODUITS PAR LES
ACTINOMYCÈTES

1. Les antibiotiques produits par les actinomycètes

Il existe plusieurs systèmes de classification des antibiotiques sur la base de différents critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme d'action et le spectre d'action. Le plus courant prend en compte leur mode d'action sur les agents infectieux. Un autre système consiste à classer les antibiotiques en fonction des souches bactériennes qu'ils détruisent (staphylocoques, streptocoques, etc.).

1.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram + et à Gram -. On distingue trois classes principales de ces antibiotiques : les β -lactamines, les glycopéptides et la fosfomycine.

La vancomycine est le premier glycopeptide isolé en 1956 à partir d'échantillon de sols prélevés en Inde et en Indonésie, contenant le germe *Streptomyces orientalis* (*Nocardia orientalis*) (MCCORMICK *et al.*, 1956). Les glycopeptides sont des molécules complexes synthétisées par des espèces de *Streptomyces* et *Actinoplanes* (REYNOLDS, 1989). Ce sont de volumineuses molécules qui ne sont actives que sur les bactéries à coloration de Gram positif. Les glycopeptides sont au même titre que les β -lactames des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne (JORDAN, 1961) (figure 12).

La fosfomycine a été isolée en 1969 à partir de culture de *Streptomyces fradiae* et d'autres espèces de bactéries du genre *Streptomyces* (HENDLIN *et al.*, 1969). La fosfomycine a un large spectre d'activité, couvrant beaucoup de bactéries pathogènes et opportunistes à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* et certaines espèces du genre *Streptococcus*) (BOGDANOVICH *et al.*, 2005) et des bactéries à coloration de Gram négative comme *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Salmonella typhi* et des espèces de *Proteus* et *Enterobacter* (FALAGAS *et al.*, 2009). Elle agit en empêchant la synthèse des parois cellulaires par inhibition des premières étapes de la formation du peptidoglycane (KAHAN *et al.*, 1974 ; SUPERTI *et al.*, 2009) (figure 13).

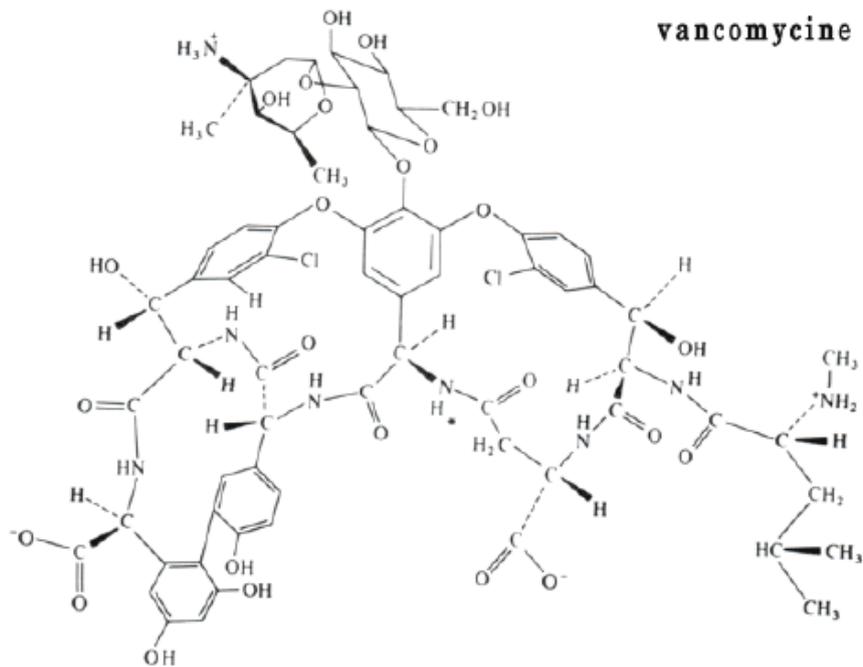


Figure 12 : Structure de la vancomycine (RAMAKRISHNAN, 1991).

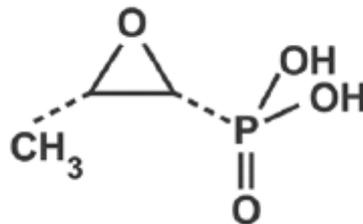


Figure 13 : Structure de la fosfomycine (CHRISTENSEN *et al.*, 1969).

1.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Différentes classes d'antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes et de la synthèse des protéines bactérienne, et ce, au niveau de l'une des trois étapes principales de la traduction : l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les antibiotiques de cette catégorie les plus importants en médecine sont les aminosides, les macrolides, les tétracyclines, les phénicolis et l'acide fusidique. La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien. Il faut donc, pour toutes ces molécules, traverser le peptidoglycane et les diverses membranes pour arriver dans le cytoplasme et atteindre leur cible : le ribosome.

1.2.1. Macrolides, Lincosamides, Streptogramines

Ces trois groupes d'antibiotiques (dits MLS), de structure chimique différente, sont apparentés par leur spectre d'activité, leur mécanisme d'action et les phénomènes de résistance. Les MLS inhibent les synthèses protéiques au niveau du ribosome. Ils se fixent tous au niveau de la sous-unité 50S (LE MINOR, 1989).

Les macrolides représentent l'un des principaux groupes d'antibiotiques utilisés en thérapeutique humaine. Le chef de file de ce groupe est l'érythromycine, qui a été isolée en 1952 de culture de *Saccharopolyspora erythrea* (anciennement appelée *Streptomyces erythraeus*) (LABEDA, 1987). Ce microorganisme produit au moins six types de molécules d'érythromycine différentes, de A à F, mais seule l'érythromycine A (figure 14) possède une vraie activité antimicrobienne. La plupart des macrolides sont produits par des espèces de *Streptomyces* et d'autres bactéries actinomycètes du sol, mais il existe également des macrolides semi-synthétiques obtenus par modification chimique des produits naturels (LABRO, 2002).

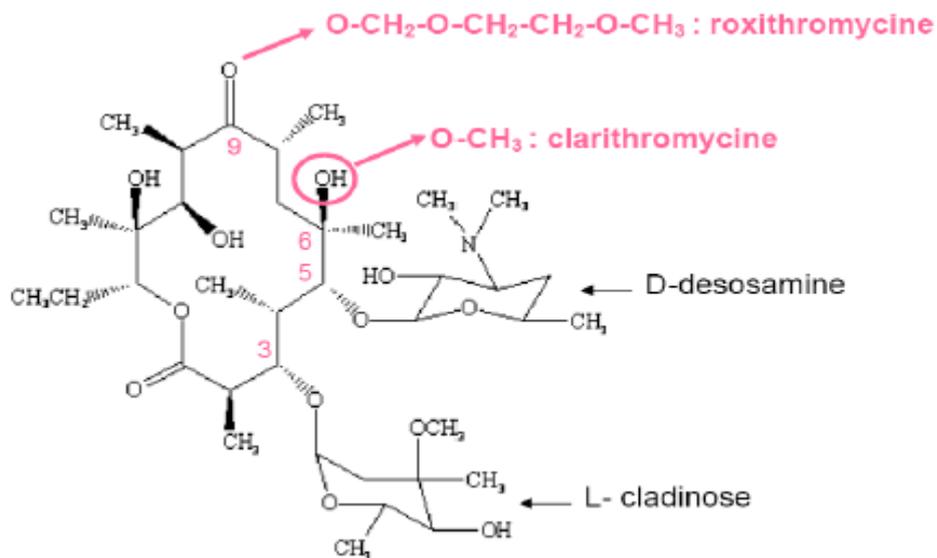


Figure 14 : Structure chimique de l'érythromycine A et exemples de modifications des substituants pour la synthèse de dérivés (ADACHI et MORIMOTO, 2002).

Les lincosamides sont des antibiotiques à spectre étroit. Le principal représentant naturel de ce groupe est la lincomycine, isolée en 1962 à partir d'un échantillon de sol prélevé dans la région de Lincoln, dans le Nebraska, aux États-Unis d'où son nom et la souche

productrice est *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* qui a été classé comme une nouvelle espèce de Streptomycètes. Il existe également un dérivé semi-synthétique chloré de cette molécule, la clindamycine. Le spectre d'action des lincosamides recouvre les coques Gram (+) (sauf *Streptococcus faecalis*) et les bactéries anaérobies (*Bacteroides fragilis*, *Clostridium* sp.) (MASON *et al.*, 1962).

La pristinamycine est une streptogramine naturelle produite par *Streptomyces pristinaespiralis* (PREUD'HOMME *et al.*, 1965). Les synergistines (ou streptogramines) sont formées de deux composés, A et B, qui agissent en synergie. La fixation du composé A favorise la fixation du composé B, ce qui expliquerait en partie la synergie et l'effet non plus bactériostatique, mais bactéricide.

1.2.2. Les phénicolés : chloramphénicol et thiamphénicol

Ce sont des antibiotiques potentiellement utiles en raison de leur large spectre, incluant les rickettsies et les Chlamydiae, et de leur bonne pénétration dans le système nerveux central, mais dont l'usage est actuellement limité à cause de leur toxicité médullaire. Leur action est le plus souvent seulement bactériostatique ; ils peuvent toutefois se révéler bactéricides sur *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Neisseria meningitidis*, voire les salmonelles et *Bordetella*. Deux molécules seulement sont utilisées en clinique : le chloramphénicol (figure 15 (A)) originellement élaboré par *Streptomyces venezuelae*, est maintenant produit par synthèse, et son dérivé le thiamphénicol (figure 15 (B)). Comme les macrolides et les lincosamides, les phénicolés se fixent à la sous-unité 50S des ribosomes bactériens, ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la liaison du complexe amino-acyl-ARNt à son site de fixation, et donc la réaction de transpeptidation (LE MINOR, 1989).

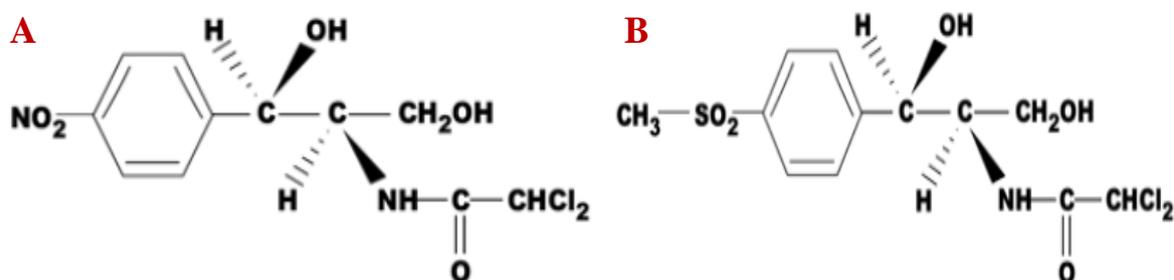


Figure 15 : Structure du Chloramphénicol (A) ; Structure du Thiamphénicol (B) (KITOUNI, 2007).

1.2.3. Les aminoglycosides

Les aminosides ou aminoglycosides, plus correctement dénommés aminosidesaminocyclitols (AMAC), sont des antibiotiques constitués par un ou plusieurs cycles glycosidiques liés à un aminocyclitol. Les produits les plus anciens comme la streptomycine, premier agent anti-tuberculose découvert en 1943 par SELMAN WAKSMAN à partir de culture de *Streptomyces griseus*, et dont la commercialisation a débutée en 1944 suivie par celle de la néomycine, la kanamycine, la paromomycine, la lividomycine et d'autres aminoglycosides naturels jusqu'en 1967. Au-delà de cette date, les composés mis sur le marché comme l'amikacine sont semi-synthétiques (BUSSCHER *et al.*, 2005). Les aminosides naturels sont élaborés surtout par des *Streptomyces* (ils prennent alors le suffixe « -mycine »), quelques-uns par des *Micromonospora* (gentamicine, sisomicine) ou par des *Bacillus* (butirosines) (LE MINOR, 1989). Les AMAC perturbent la synthèse des protéines au niveau de la fraction 30S du ribosome bactérien (COX *et al.*, 1964 ; DAVIES, 1964 ; WRIGHT *et al.*, 1998).

1.2.4. Les tétracyclines

Les tétracyclines (figure 16) constituent une vaste famille inaugurée en 1948 avec l'auroéomycine naturellement élaborée par *Streptomyces aureofaciens*, un organisme du sol isolé par les laboratoires LEDERLE vers la fin des années 1940 (DUGGAR, 1948). Peu après, une autre espèce de *Streptomyces* productrice d'antibiotiques fut identifiée par les laboratoires PFIZER. Cet organisme nommé *Streptomyces rimosus* en raison de son apparence fissurée sur gélose, produisait la terramycine (FINLAY *et al.*, 1950), une substance au spectre antibiotique identique à celui de l'auroéomycine. Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre, seulement bactériostatiques. Néanmoins, leur usage est aujourd'hui limité par l'émergence de résistances.

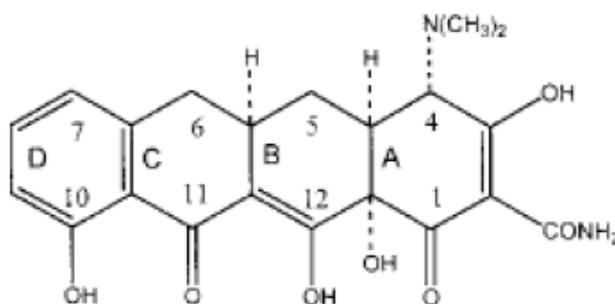


Figure 16 : Squelette des tétracyclines (KITOUNI, 2007).

1.3. Antibiotiques agissant au niveau de l'ARN polymérase

L'ARN polymérase est une enzyme multimérique composée de 5 sous-unités : $\alpha 2\beta\beta'\omega$ qui forment le core de l'enzyme et du facteur σ . Bien que le core de l'enzyme soit catalytiquement actif, il est incapable d'initier la transcription sans la liaison du facteur σ (BURGESS, 1969).

Le cycle transcriptionnel se décompose en trois étapes qui sont l'initiation, l'élongation et la terminaison. Le cycle commence avec la liaison de l'ARN polymérase au promoteur et se termine par le relargage du brin transcrit.

Bien que la rifampicine et ses dérivés soient les seuls inhibiteurs de l'ARN polymérase en usage clinique, de nombreuses molécules ont été décrites comme ciblant cette enzyme indispensable aux fonctions essentielles des bactéries. Les composés décrits à ce jour comprennent des produits naturels dont la plupart sont produits par des actinomycètes et, plus récemment, des molécules synthétiques.

1.3.1. Les ansamycines

Les ansamycines constituent une large famille de composés chimiques, ce sont des molécules macrocycliques isolées à partir d'une souche d'*Amycolatopsis mediterranei* (anciennement appelée *Streptomyces mediterranei* puis *Nocardia mediterranei*) (OPPOLZER, 1964). Deux groupes de molécules sont différenciés au sein de la famille des ansamycines :

- Les ansamycines de type naphthalène regroupent des composés montrant une activité antibactérienne ou antivirale, ils inhibent spécifiquement la transcription bactérienne (rifamycines, halomicine, streptovaricines, tolypomycines, naphtomycines, awamycine et ansathiazine).
- Les ansamycines du type benzénique qui possèdent des activités antifongiques et antitumorales.

1.3.2. La streptolydigue

La streptolydigue est un antibiotique produit par *Streptomyces lydigus* et isolé en 1955 (DEBOER *et al.*, 1955-1956 ; CRUM *et al.*, 1955-1956 ; LEWIS, 1955-1956). Il est également connu sous le nom de portamycine. Cette molécule possède une activité à large

spectre sur les bactéries à Gram positif, mais ne peut généralement pas passer à travers les membranes des bactéries à Gram négatif, à l'exception de *Pasteurella multocida* (DEBOER *et al.*, 1955-1956). Elle bloquerait les étapes d'initiation, d'élongation (SIDDIKOL, 1969 ; CASSANI, 1971 ; MCCLURE, 1980 ; TUSKE *et al.*, 2005). Par contre, elle n'agit pas sur les ARNp I, II et III des eucaryotes.

1.3.3. La lipiarmycine

La lipiarmycine est un antibiotique décrit pour la première fois en 1975 (CORONELLI, 1975 ; PARENTI, 1975 ; SERGIO, 1975), aussi connu sous le nom de fidaxomicine (SULLIVAN, 2010).

Cette molécule est produite par plusieurs micro-organismes : *Actinoplanes deccanensis* ATCC 21938, *Micromonospora echinospora* et par *Dactylosporangium aurantiacum*.

Il s'agit d'un antibiotique macrocyclique, légèrement acide, actif contre un large spectre de bactéries à Gram positif (CORONELLI, 1975), et en particulier contre les souches de *Clostridium*. Dès 1975 il a été décrit comme un inhibiteur de la transcription et, de façon moindre, de la réplication de l'ADN (CORONELLI, 1975 ; SERGIO, 1975).

1.3.4. Le peptide GE23077

GE23077 est un inhibiteur de l'ARN polymérase isolée en 2004 (CICILIATO *et al.*, 2004) lors d'un criblage d'agents antibactériens effectué chez des souches peu communes d'actinomycètes. La souche productrice a été classée comme appartenant à *Actinomadura sp.* En phase stationnaire elle produit un complexe composé de deux couples d'isomères : A1, A2 et B1, B2. La structure de ces composés a été résolue en 2005 (MARAZZI *et al.*, 2005). Les peptides GE23077 agissent sur l'initiation de la transcription et ont un mécanisme d'action proche de celui de la rifampicine.

1.3.5. Les pyrrothines

Les membres de la famille des pyrrothines ont été découverts en 1952 (CELMER *et al.*, 1952). Les composés les mieux caractérisés sont la thiolutine et son analogue structural l'holomycine. La thiolutine fait partie des douze métabolites produits par *Streptomyces luteoreticuli*. Il s'agit d'un antibiotique à large spectre capable d'inhiber la croissance des

bactéries, des levures, et des champignons (SENECA *et al.*, 1952 ; JIMENEZ *et al.*, 1973). Cette molécule a été classée comme inhibiteur de l'ARNp (JIMENEZ *et al.*, 1973).

2. Les antifongiques

Ces molécules peuvent être issues d'une voie naturelle, de synthèse chimique ou semi-synthétique, ceux d'origine naturelle sont produits par les actinomycètes ou par des champignons, à titre d'exemple, l'Amphotéricine B qui est produite par *Streptomyces nodus* (RIPERT, 2013).

2.1. Les antifongiques produits par les actinomycètes (les polyènes)

Les polyènes (l'Amphotéricine B et la nystatine) sont des molécules antifongiques d'origine naturelle caractérisées par une structure complexe avec un nombre de doubles liaisons conjuguées HC=CH, ce nombre permet de définir la nature du polyène, l'exemple du diène pour deux doubles liaisons, ou encore triène pour trois doubles liaisons.

2.1.1. La nystatine

Le plus ancien des antifongiques naturels, il a été isolé de *Streptomyces noursei* en 1950, elle n'est utilisée que par voie cutanée ou orale en raison de sa toxicité par voie parentérale (injectable), elle est le plus souvent indiquée pour le traitement courant des candidoses digestives, vaginales et cutanées (MOULY et SELLIER, 2004 ; RIPERT, 2013).

2.1.2. Amphotéricine B

Isolée de *Streptomyces nodosus* en 1955, est un macrolide polyénique amphotère (avec 7 doubles liaisons), il inhibe spécifiquement la croissance de nombreuses levures et moisissures et est sans action contre les bactéries. L'amphotéricine B est un puissant antifongique qui inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seul polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. (POURRIAT et MARTIN, 2005) (figure 17).

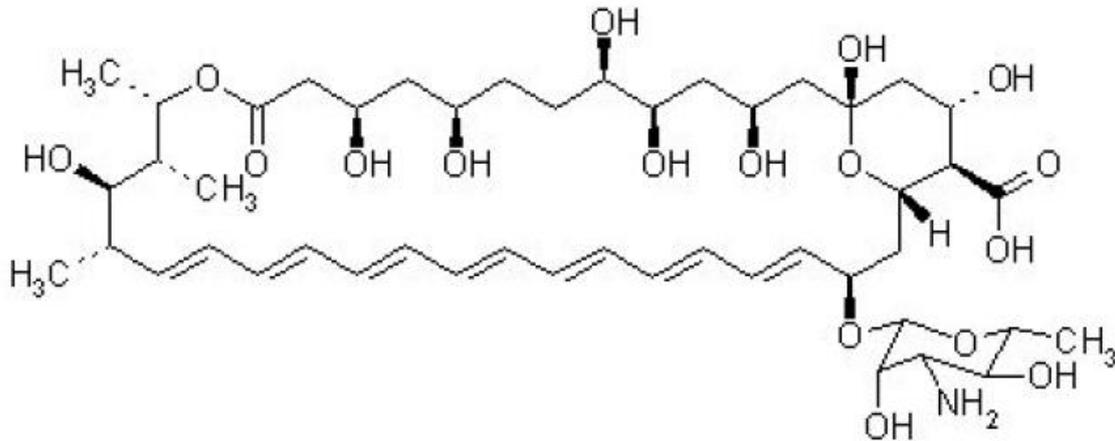


Figure 17 : Amphotéricine B (BOUDMAGH, 2007).

2.2. La nikkomyicine

La nikkomyicine est une nouvelle classe antifongique d'origine naturelle isolée de *Streptomyces tendae*. Cet antifongique induit différents mécanismes d'action selon la composition du milieu de culture, il inhibe la chitine synthase (Chs) responsable de la formation de chitine de la paroi fongique, cependant *Candida albicans* se trouve être intrinsèquement résistante à cette molécule (FENG *et al.*, 2014).

KIM *et al.* (2002) explique ce phénomène par la présence de trois isophormes de la Chs, la CaChs1, CaChs2 et la CaChs3.

2.3. Mode d'action des polyènes

Le spectre d'action des antifongiques polyénique est très large du fait de son mécanisme d'action sur la membrane fongique, ces antifongiques sont utilisés pour le traitement de l'ensemble des mycoses profondes. La fixation de l'Amphotéricine B sur l'ergostérol endommage la membrane en entraînant la formation de pores dans celle-ci, provoquant ainsi des lésions irréversibles et la perte des constituants cellulaire (SHEIKH *et al.*, 2013).

3. Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les Actinomycètes

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 nutritionnels et physicochimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers (STRUB, 2008).

3.1. Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs (STRUB, 2008) entre autres chez les actinomycètes.

Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectant fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotiques en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments (MARTIN et DEMAIN, 1980).

3.1.1. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques

Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse (répression catabolique ou effet glucose) (LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990).

La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol (LEBRIHI *et al.*, 1988 ; LOUNES *et al.*, 1995), comme le montre le tableau X.

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

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

3.1.2. Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques

Si la croissance des micro-organismes réclame des concentrations en phosphate variant de 0,3 à 300 M, la synthèse de très nombreux métabolites secondaires est inhibée par des concentrations trop élevées (LARPENT et LARPENT-GOURGAUD, 1990).

Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques, chez les actinomycètes. Non seulement le phosphate affecte le niveau de production des antibiotiques et les vitesses de formation, mais il peut aussi retarder le délai d'initiation de la synthèse des métabolites secondaires (GERSH *et al.*, 1978 ; DEKLEVA *et al.*, 1985).

3.1.3. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques

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

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

Tableau XI : Production d'antibiotiques chez les actinomycètes favorisée par les acides aminés.

Famille chimique	Antibiotiques	Producteurs	Acides aminés	Références
Aminoglycosides	Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	Proline	DULANEY, 1948
Béta-lactamines	Céphamycine	<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Asparagine / Glutamine	BRANA <i>et al.</i> , 1985
Phénicolés	Chloramphénicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	Proline	SHAPIRO et VINING, 1985
Macrolides	Spiramycine	<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Valine	UNTRAU <i>et al.</i> , 1994

3.2. Effet du pH, de la température et du temps d'incubation

Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectent énormément la production des métabolites secondaires (SMAOUI, 2010).

Depuis longtemps, l'influence du pH a été démontrée sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture ; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline et un pH basique favorise la sécrétion de tétracycline (ASANZA-TERNUEL *et al.*, 1977).

Concernant la température, la souche *Streptomyces* BT-408 possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40 °C avec un optimum à 30 °C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide est variable d'une espèce à une autre. En effet, pour la souche de *Streptomyces* TN 58, la production de biomolécules commence après 60 heures d'incubation pour atteindre un maximum après 72 heures. Elle reste stable jusqu'à 80 heures puis elle décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 heures (MELLOULI *et al.*, 2004).

CHAPITRE III
RÉSISTANCE
BACTÉRIENNE AUX
ANTIBIOTIQUES

1. Généralités sur les antibiotiques

En 1942, WALKSMAN définit les antibiotiques comme « des substances chimiques naturelles produites par des micro-organismes qui ont le pouvoir d'inhiber d'autre micro-organisme ».

Le mot antibiotique est aujourd'hui employé dans un sens plus large incluant, en outre, toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de cette propriété. (SINGLETON, 2005).

On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration, de la taille de l'inoculum bactérien, de l'état du milieu (solide ou liquide) et de son pH (PRESCOT *et al.*, 1993 ; MOUTON *et al.*, 2000).

La figure suivante résume quelques origines et propagations de la résistance aux antibiotiques.

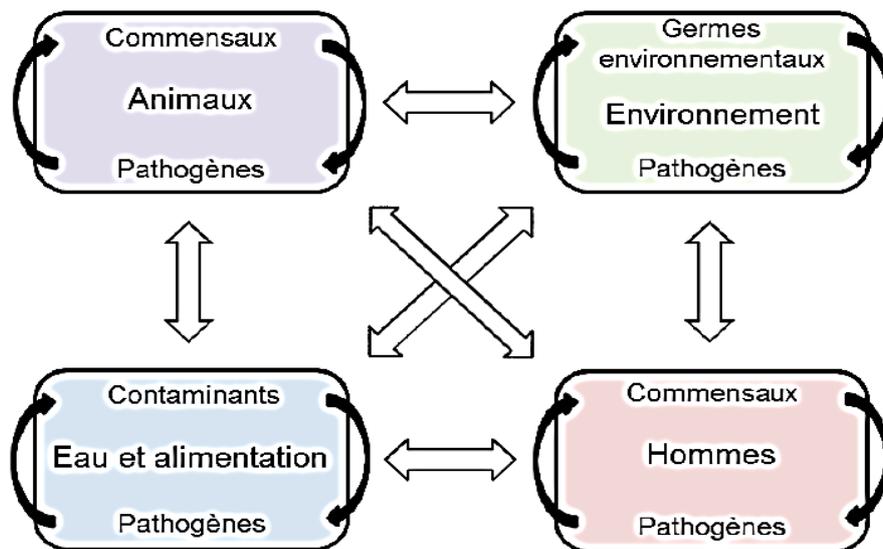


Figure 18 : Vue simplifiée de l'épidémiologie des résistances aux antibiotiques, d'après BOERLIN et WHITE (2006).

2. Définition de la résistance

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque sa concentration minimale inhibitrice CMI est plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (TORTORA *et al.*, 2011).

Cette définition bactériologique de la résistance doit être complétée par deux autres : une clinique qui associe la notion de succès et d'échec clinique (qui échappe au traitement). L'autre génétique correspond à la présence de gènes de résistance au sein de la bactérie, détectée par des techniques biophysiques et/ou génétiques (SINGLETON, 1999 ; PRESCOTT *et al.*, 2010 ; TORTORA *et al.*, 2011).

Parfois, la résistance à un antibiotique confère de la résistance à un autre antibiotique, et c'est ce que l'on appelle la résistance croisée. Les bactéries sont dites multirésistantes lorsqu'à la suite d'une accumulation de résistances naturelles et acquises, elles ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques (TORTORA *et al.*, 2011).

3. Bases génétiques de la résistance

La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome, soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons. La résistance peut-être soit naturelle ou acquise (TORTORA *et al.*, 2011).

3.1.Résistance naturelle

On parle de résistance naturelle lorsque toutes les souches d'une même espèce sont résistantes à un antibiotique. L'expression d'un caractère inné, partagé par l'ensemble de la communauté bactérienne, rend inappropriée l'utilisation de certains antibiotiques (JIHANI, 2013).

Des particularités structurales de la paroi cellulaire, empêchant les antibiotiques d'accéder à leur cible, où l'absence de cible est autant de facteurs, qui conditionnent la résistance naturelle, c'est l'exemple des bactéries du genre *Mycoplasma*. Dépourvus de cet élément constitutif, les mycoplasmes présentent une résistance intrinsèque aux β -lactames, dont le mode d'action consiste en une inhibition de la synthèse du peptidoglycane (PRESCOTT *et al.*, 2010 ; TORTORA *et al.*, 2011).

D'après TORTORA *et al.* (2011), la résistance bactérienne naturelle est permanente et d'origine chromosomique. Elle est stable, transmise à la descendance (transmission verticale), mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale). Elle constitue aussi un critère d'identification.

3.2. Résistance acquise

La résistance acquise survient lorsque, seules, quelques souches d'une même espèce, normalement sensibles à un antibiotique, deviennent résistantes. Cette résistance peut être acquise par mutation spontanée ou par transfert de gènes. La résistance due à une mutation se transmet seulement verticalement et non horizontalement (NAUCIEL et VILDE, 2005 ; JIHANI, 2013).

Une mutation n'affecte qu'un caractère et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. Ces derniers ne sont pas des agents mutagènes, mais ils contribuent à sélectionner, de manière spontanée, des mutants résistants au sein d'une population bactérienne. La cause principale de l'évolution et de l'extension des résistances aux antibiotiques est leur prescription à grande échelle en thérapeutique humaine. L'utilisation d'antibiotiques, nécessitant de longues périodes de traitement ou à large spectre d'action, est aussi un facteur de risque pour la propagation des résistances (MADIGAN et MARTINKO, 2007 ; TORTOTA *et al.*, 2011).

- Transfert de gènes

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries Gram positif que Gram négatif. Elle peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles tels que les plasmides et les transposons qui se transmettent verticalement ou horizontalement par transduction, conjugaison ou transformation (MADIGAN et MARTINKO, 2007) (figure 19).

La dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques peut s'effectuer au sein d'une même espèce, mais aussi d'une espèce bactérienne à l'autre. Ainsi, les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la vancomycine (SARV) auraient acquis ce caractère suite au transfert plasmidique, réalisé par conjugaison avec *Enterococcus faecalis*.

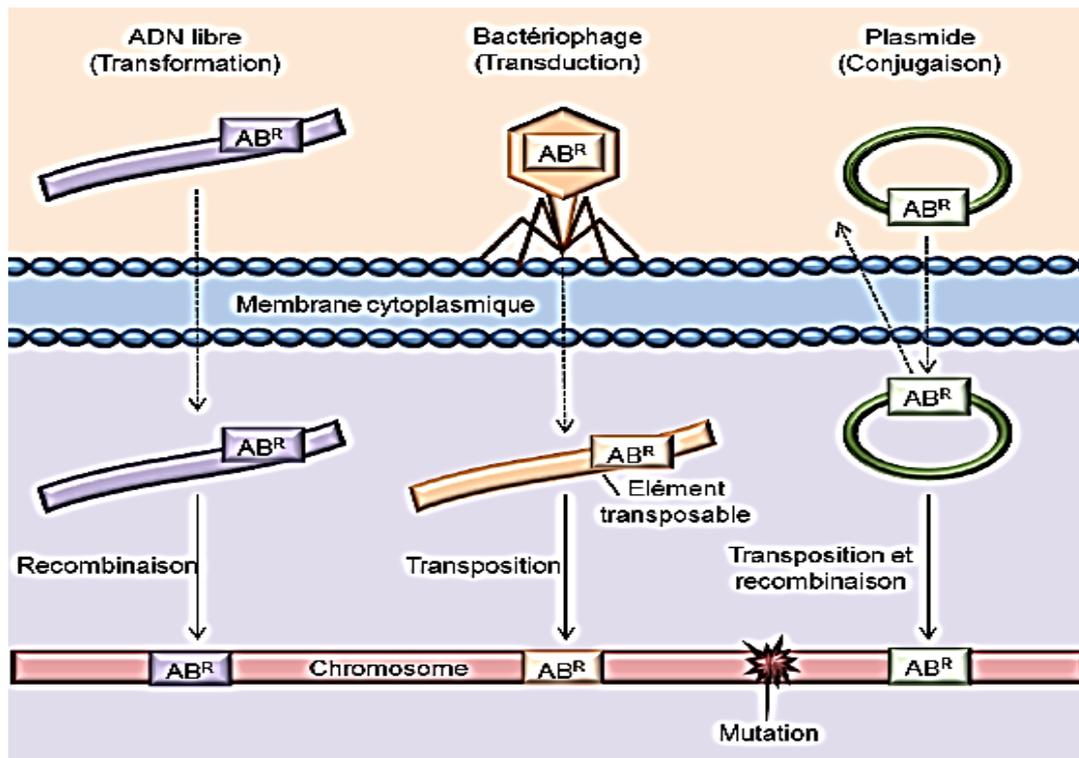


Figure 19 : Voies d'acquisition de résistance aux antibiotiques (ALEKSHUN et LEVY, 2007).

4. Mécanismes de résistance

4.1. Mutation de la cible de l'antibiotique

Chaque antibiotique agit en se fixant sur une cible précise dans la cellule : paroi, ribosome ou enzyme. La présence d'une modification consécutive à une mutation modifie le site de fixation et empêche ainsi la liaison de l'antibiotique. C'est un des mécanismes de résistance à la streptomycine, l'un des premiers antibiotiques utilisés pour traiter la tuberculose (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

4.2. Modification de la cible de l'antibiotique

Une enzyme spécifique effectue une modification chimique covalente de la cible, par exemple une méthylation, ce qui inhibe la fixation de l'antibiotique, comme dans le cas précédent, mais sans qu'il y ait altération du génome. Ce type de mécanisme est rencontré dans la résistance aux macrolides, où il existe une méthylase qui confère la résistance en modifiant l'ARN ribosomique au niveau du site de liaison de l'antibiotique (GAUDY et BUXERAUD, 2005).

4.3.Surexpression de la cible de l'antibiotique

En produisant d'avantage la macromolécule ciblée, la bactérie arrive à maintenir suffisamment d'activité biologique pour se développer, malgré la présence de l'antibiotique (LOZNIIEWSKI et RABAUD, 2010).

4.4.Modification de l'antibiotique

De nombreuses souches résistantes fabriquent une enzyme qui modifie ou qui clive la molécule d'antibiotique, la rendant inactive. C'est le mécanisme principal de résistance aux β -lactamines (famille de la pénicilline et des céphalosporines) qui implique les enzymes de la famille des β -lactamases (CARLE, 2009).

4.5.Réduction de la perméabilité membranaire

La bactérie « ferme » les pores par lesquels l'antibiotique pénètre dans la cellule. Ces pores sont normalement constitués de protéines qui forment des canaux et que l'on appelle des porines. Les bactéries résistantes réduisent leur nombre (TENOVER, 2006).

4.6.Résistance par efflux

Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par transport actif hors de la cellule. Ce mécanisme à un rôle clé dans la physiologie bactérienne par la préservation de l'équilibre physicochimique du milieu intracellulaire, en s'opposant à l'accumulation de substances toxiques. C'est l'un des principaux mécanismes de résistance de *Pseudomonas aeruginosa*, pathogène opportuniste responsable de nombreuses infections nosocomiales (TENOVER, 2006).

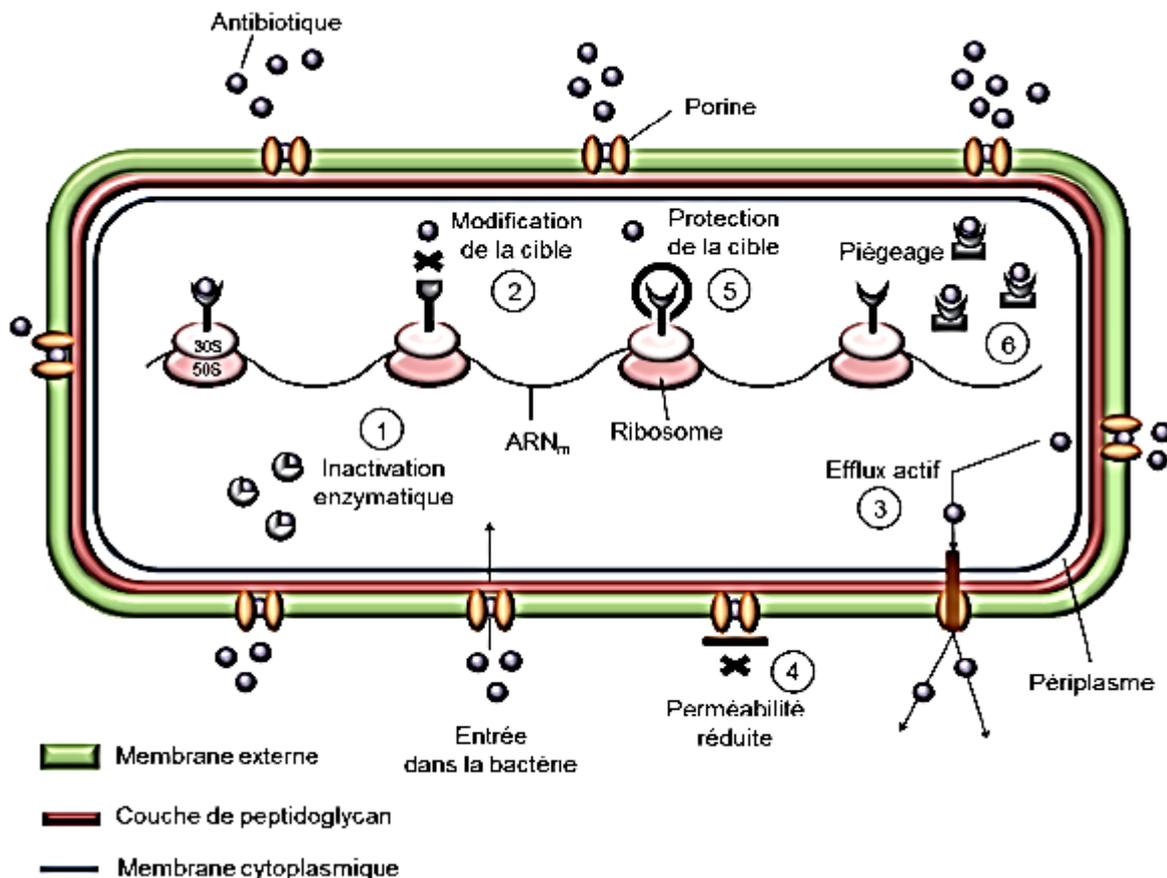


Figure 20 : différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative. 1 : inactivation enzymatique de l'antibiotique, 2 : modification de la cible de l'antibiotique, 3 : efflux actif de l'antibiotique, 4 : perméabilité réduite, 5 : protection de la cible de l'antibiotique, 6 : piégeage de l'antibiotique (GUARDABASSI et COURVALIN, 2006).

5. Recherche de nouvelles molécules antibiotiques

Pour pallier aux problèmes de la résistance microbienne aux antibiotiques actuels et des risques d'épidémies, il faut trouver de nouvelles molécules, qui agissent différemment, efficaces, et qui ne sont donc pas sensibles aux mécanismes de résistance existant, car les molécules en essai clinique aujourd'hui sont pour la plupart des dérivés des classes chimiques pour lesquelles il y a déjà des mécanismes de résistance. Or, bien que cette méthode soit historiquement la méthode de choix, les modifications structurales apportées à la molécule ne changent pas de façon significative ses interactions avec sa cible (PAYNE *et al.*, 2007).

**MATÉRIEL ET
MÉTHODES**

Partie I : Matériel

1. Souches d'actinomycètes

Trois souches d'actinomycètes ont été utilisées pour l'extraction des molécules bioactives. Il s'agit des souches S1 (R1), S2 (R2') et S3 (R15') aimablement fournies par Mr OUELHADJ, préalablement isolées par BENYAOU A. (2015) à Ain El Hammam, Wilaya de Tizi-Ouzou. Un repiquage sur milieu Bennett qui s'est avéré être le plus favorable au développement des actinomycètes a été effectué pour revivifier les souches.

2. Matériel de laboratoire

Tableau XII : Produits chimiques et milieux de culture utilisés.

		Source	Utilisation
Solvants	Acétate d'éthyle	BiochemChemopharma France	Extraction des produits actifs à partir du surnageant
	Chloroforme	Sigma Aldrich Allemagne	
	Méthanol	Sigma Aldrich Allemagne	Extraction des produits actifs à partir du culot
Sels	Chlorure de Sodium (NaCl)	FlukaAnalytical Allemagne	Préparation de l'eau physiologique
Milieux de culture	Milieu Mueller-Hinton (MH)	CondaPronadisa Espagne	Repiquage des souches bactériennes et les différents tests
	Milieu Sabouraud	Institut Pasteur Algérie	Repiquage des souches fongiques et les différents criblages
	Milieu Bennett (gélosé et liquide)	Laboratoire de microbiologie de l'UMMTO	Culture des souches d'actinomycètes
	Hydrolyse de l'amidon, caséine (gélosé et liquide)	Laboratoire de microbiologie de l'UMMTO	Etude physiologique des actinomycètes

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

3. Appareillage

- Spectrophotomètre: Vis-7220G. Biotech Engineering. Management CO.LTD (UK).
- Etuve : BINDER. Allemagne.
- Balance de précision : KERN 770. Allemagne.
- Centrifugeuse : Hettich Universal / K2S. Allemagne.
- Autoclave : WEBECO. Allemagne.
- Bain Marie : MEMMERT. Allemagne.
- Agitateur à barreau magnétique chauffant : GERHARDT. Allemagne.

4. Choix des microorganismes cibles

Les souches bactériennes utilisées sont des espèces Gram négatif et Gram positif, dont la plupart sont résistantes aux antibiotiques. Deux des souches bactériennes utilisées sont des souches de référence obtenues de l'American Type Culture Collection (ATCC). Une coloration de Gram est employée pour vérifier la pureté des souches. Les souches fongiques utilisées sont des espèces pathogènes responsables de mycoses chez l'homme.

Tableau XIII: Les souches microbiennes utilisées.

Souches bactériennes	<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie de l'UMMTO
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	Gram positif	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Gram négatif	Laboratoire de microbiologie du CHU de Tizi-Ouzou
	<i>Escherichia coli</i>	Gram négatif	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Gram positif	
		<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Gram négatif
Souches fongiques	<i>Candida albicans</i>	Levure	Laboratoire de microbiologie de l'UMMTO
	<i>Aspergillus niger</i>	Moisissure	

5. Les antibiotiques et antifongiques utilisés

Tableau XIV : Les antibiotiques et l'antifongique utilisés.

	Nom	Abréviation	Dose	Compagnie
Antibiotiques	Amoxicilline	AMX- AX- AM	25µg/disque	Bioanalyse Inde
	Oxytétracycline	O	30 µg/disque	
Antifongique	Amphotéricine B Fungizone®	/	10%	Haupt Pharma Allemagne

Partie II : Méthodes

1. Caractérisation partielle des souches d'actinomycètes

1.1. Critères morphologiques

1.1.1. Macromorphologie

Les critères sont d'ordre macroscopique ; il s'agit de : la forme générale des colonies, leur taille, leur consistance, la couleur du mycélium végétatif et du mycélium aérien, la diffusion ou non de pigments dans le milieu, la couleur des pigments diffusables.

1.1.2. Micromorphologie

Elle est observée sur le milieu Bennett, à l'aide d'un microscope optique, en utilisant les grossissements (10x10) et (10x40). Elle consiste en premier lieu à voir les structures en place et la sporulation caractéristique des souches étudiées, ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat. Puis à faire une coloration de Gram.

1.2. Coloration de Gram

Mettre une goutte d'eau distillée stérile sur une lame, puis déposer une colonie sur la goutte d'eau, bien étalé, ensuite fixé à la chaleur ; le frottis est coloré pendant une minute au violet de Gentiane ; il est ensuite traité pendant 45 seconde (x2) par une solution de Lugol. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95% pendant 30 seconde ; l'effet de l'alcool est stoppé par lavage à l'eau du robinet. À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration pendant une minute à la fushine pour colorer les cellules Gram-. Après un rinçage à l'eau du robinet, on sèche le frottis au-dessus de la flamme du bec Bunsen et on l'examine au G x 1000.

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram négatif » sont colorées en rose ou en rouge (DELARRAS, 2007).

1.3. Critères biochimiques

1.3.1. Recherche de la β -galactosidase

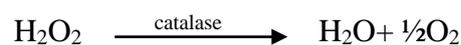
La recherche de la β -galactosidase dans l'identification d'une bactérie est réalisée avec le test ONPG. Quelques millilitres de la souche préalablement mise en suspension sont versés dans un tube à essai auquel on ajoute un disque ONPG. L'apparition d'une couleur jaune au bout d'une heure indique la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

1.3.2. Recherche de l'oxydase

Quelques millilitres de la souche préalablement mise en suspension sont versés dans un tube à essai auquel 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.

1.3.3. Recherche de la catalase

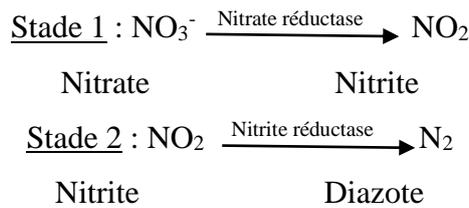
Cette enzyme permet la dégradation du H_2O_2 qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air :



Cette réaction est expérimentalement démontrée par contact de la culture avec une solution de H_2O_2 : une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène: le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles: le test catalase est négatif (DELARRAS, 2007).

1.3.4. Recherche de la Nitrate Réductase

La respiration des bactéries ne s'effectue pas exclusivement sur l'oxygène. Les nitrates peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour former des nitrites (Stade 1). Parfois la réduction peut-être poursuit jusqu'au stade diazote (Stade 2) selon le schéma réactionnel suivant :



L'utilisation des nitrates comme accepteurs d'électron nécessite la présence d'une enzyme localisée dans la membrane plasmique de la bactérie : la Nitrate Réductase. Elle est mise en évidence par la présence de nitrites ou l'absence de nitrite après incubation de la bactérie sur un milieu nitraté.

Des tubes contenant le bouillon nutritif de nitrates de potassium sontensemencés, puis incubés à 28°C. Au bout de 7 jours d'incubation, 3 gouttes des réactifs NRI et NRII sont respectivement ajoutées au milieu (MARCHAL et BOURDON, 1991).

En cas de réaction positive: les nitrites réagissent avec les réactifs en donnant une coloration rouge. La bactérie possède donc une nitrate réductase qui effectue la réaction jusqu'au stade 1. La bactérie sera classée donc NR+.

En cas de réaction négative: absences de nitrites \Leftrightarrow on rajoute de la poudre de zinc ayant pour effet de réduire les nitrates en nitrites, deux cas de figure se présentent alors :

- Coloration rouge: le zinc réduit les nitrates en nitrites, les réactifs ajoutés précédemment réagissent donc avec ces nitrites et donnent une coloration rouge ; la bactérie ne possède donc pas de nitrate réductase ;
- Absence de coloration : les nitrates ont été transformés par la bactérie en nitrites puis la dénitrification a permis l'obtention de diazote. La réaction est fortement positive (2eme stade). La bactérie la nitrate réductase.

1.3.5. Etude de la fermentation des sucres (Glucose, Lactose, Saccharose) et recherche du caractère H₂S à l'aide du milieu d'identification TSI

La gélose TSI (Triple Sugar Iron) permet l'identification des bactéries par la mise en évidence rapide de la fermentation du lactose, du glucose (avec ou sans production de gaz), du saccharose et de la production de sulfure d'hydrogène H₂S. 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 (MARCHAL et BOURDON, 1991).les résultats se manifestent comme suit :

- Les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur de ph) ;
- Pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la concentration de ce sucre est de l'ordre de 1/10^{ème} 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 une réalcalinisation plus prononcée; par contre, la réaction acide (couleur jaune) est maintenue en profondeur dans le culot du tube ;
- Les germes qui fermentent le lactose et/ou 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 soit par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

1.3.6. 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 seul source de carbone et d'énergie.

La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une pipette Pasteur stérile avec un inoculum de la souche. L'incubation s'effectue à 28°C pendant 7 jours (MARCHAL et BOURDON, 1991).

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 qui est un triacide sera transformé en diacide, entraînant ainsi 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).

1.3.7. Caractère mannitol mobilité

Le milieu Mannitol Mobilité est un milieu faiblement gélosé permettant de tester simultanément la mobilité et l'utilisation du mannitol (GUIRAUD, 1998) :

- La fermentation du mannitol conduit à la formation de fructose qui est lui-même dégradé en acides à courtes chaînes induisant ainsi une acidification du milieu dont la couleur vire vers le jaune (changement de couleur de l'indicateur de pH : rouge de phénol) ;
- La mobilité se traduit par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation.

1.3.8. Détermination de la voie d'attaque des glucides

Le Milieu pour l'Etude de la Voie d'Attaque des Glucides (MEVAG) : il s'agit d'une gélose semi-solide généralement composée de glucose et de rouge de phénol en guise d'indicateur de 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 des respirations, le glucide est oxydé en CO₂, par le dioxygène (ou un autre oxydant minéral) ;
- 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 deux 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, on aura 3 lectures possibles :

- Virage au jaune dans les deux tubes \Leftrightarrow Métabolisme fermentaire ;
- Virage au jaune du tube non recouvert de vaseline \Leftrightarrow Métabolisme oxydatif ;
- Pas de virage de couleur au niveau des deux tubes \Leftrightarrow Bactérie inactive vis-à-vis des du sucre.

1.3.9. Caractères Rouge de Méthyle et Voges Proskauer

Les caractères RM (Rouge de Méthyle) et VP (Voges Proskauer) sont étudiés dans le milieu Clark et Lub ; ce dernier permet l'identification de la voie de fermentation des microorganismes. Il existe plusieurs voies fermentaires dont la voie des acides mixtes et la voie du butylène glycol :

- La réaction RM consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, les bactéries produisant des acides organiques (acide formique, acétique, lactique, butyrique, succinique, malique, oxalique, etc.) par la voie des acides mixtes. Dans le cas d'une réaction positive, le milieu vire au rouge par acidification, soit fermentation des acides mixtes. A l'inverse, la coloration jaune montre un milieu peu acide ou réalcalinisé, soit une absence de fermentation des acides mixtes.
- La réaction VP consiste à mettre en évidence, par une réaction colorée, les bactéries produisant butandiol et l'acétoïne par la voie du butylène glycol (fermentation butanediolique). La production d'acétoïne est mise en évidence par l'ajout de soude IN (VPI) et de α -naphtol (VP II) ce qui provoque un virage du milieu vers la couleur rose.

La souche préalablement mise en suspension estensemencée sur le milieu Clarck et Lub, puis incubée à 28°C pendant 7 jours. Le milieu est ensuite réparti sur deux tubes, l'un pour la réaction RM et l'autre pour VP :

- Réaction RM: ajout de deux 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 : ajout de trois gouttes d' α -naphtol et trois gouttes de solution de soude. Laisser le tube ouvert et le maintenir en position inclinée afin de maximiser la surface du liquide en contact avec l'oxygène. Laisser agir environ 10 minutes.

1.3.10. Recherche de la production d'indole

Le milieu EPE (eau peptonée exempte d'indole) estensemencé de quelques gouttes de la souche préalablement mise en suspension. La lecture est effectuée après 7 jours d'incubation à 28°C. L'indole est mis en évidence par l'addition du réactif de Kovacs ; la réaction forme un composé coloré intense, ce dernier se concentre à la surface du tube forment une sorte d'anneau (MARCHAL et BOURDON, 1991).

1.4.Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé en cultivant les souches d'actinomycètes sur milieu Bennett gélosé contenant 1 % d'amidon soluble et 0,5 % de glucose selon la méthode de 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, les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

1.5.Hydrolyse de la caséine

Les souches sontensemencées sur un milieu gélosé contenant 1 % de lait écrémé puis incubé à 28°C pendant 14 jours. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies témoigne de la dégradation de la caséine (STANECK et ROBERTS, 1974 ; GERALDINE *et al.*, 1981).

1.6.Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de lait écrémé en poudre à 10 % sontensemencés et incubés à 28°C. Après 14 jours d'incubation, une observation permet de noter la coagulation ou la peptonisation du lait provoquée par les souches d'actinomycètes. (WILLIAMS et CROSS, 1971).

2. Evaluation de l'activité antimicrobienne

2.1.Repiquage des espèces microbiennes

Afin d'avoir des cultures jeunes, les différentes espèces bactériennes ont été repiquées par la méthode des stries, puis incubées à 37°C/24h pour obtenir des colonies isolées qui vont servir à la préparation de l'inoculum. Les souches fongiques ont été repiquées de la même manière, l'incubation est faite à 28°C/72h.

2.2.Standardisation des souches

2.2.1. Standardisation des souches d'actinomycètes

Des suspensions de spores des trois souches d'actinomycètes sont préparées dans de l'eau physiologique stérile. Leur opacité doit être équivalente à une densité optique (DO) de 0,08 à 0,1 lue à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond à une concentration de 10^6 à 10^7 UFC/ml.

2.2.2. Standardisation de l'inoculum des bactéries cibles

La méthode utilisée est celle de la mesure de la densité optique (DO), à l'aide d'un Spectrophotomètre, d'une suspension bactérienne. La DO doit être comprise entre 0,08 et 0,1 mesurée à une longueur d'onde de 625 nm, qui correspond à une concentration de 10^6 à 10^7 UFC/ml. Cette étape est effectuée avant chaque test.

2.2.3. Standardisation de l'inoculum des souches fongiques

La méthode utilisée est celle du dénombrement sur cellule de Malassez. La charge de l'inoculum utilisé est d'environ 10^7 UFC/ml (MATAN et MATAN, 2008). Cette opération est répétée avant chaque test effectué.

- Comptage des cellules par la cellule de Malassez :

La cellule de Malassez est un hématimètre qui permet de compter le nombre de cellules en suspension dans une solution. Il s'agit d'une lame de verre sur laquelle un quadrillage a été gravé de 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés, 25 claires et 50 divisés (lignes horizontales), pour un total de 100 rectangles. Le quadrillage total de la cellule a un volume de $1 \mu\text{l}$.

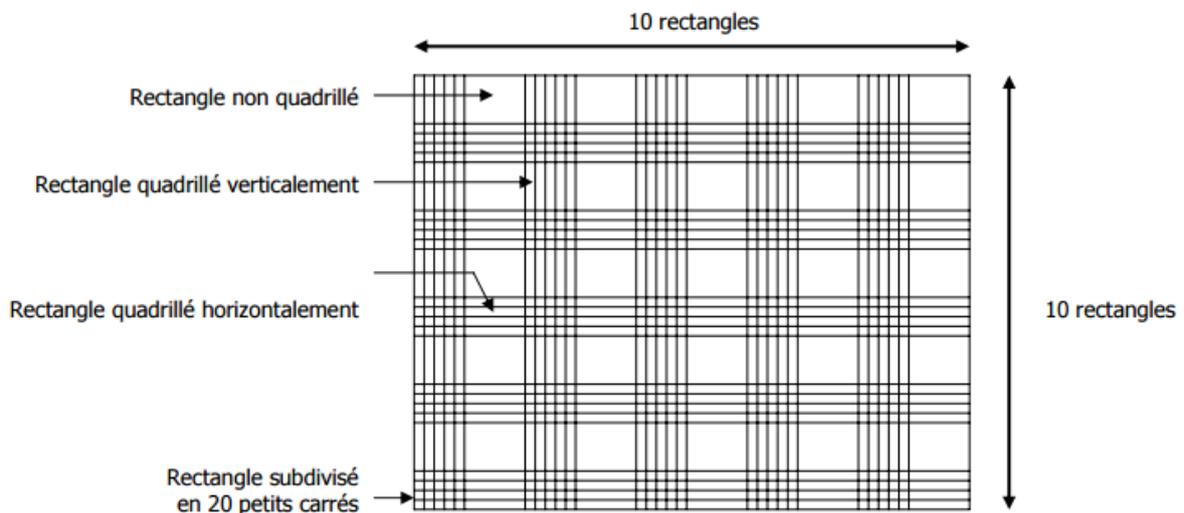


Figure 21 : Quadrillage de la cellule de Malassez (MATAN et MATAN, 2008).

Principe de comptage :

- On compte le nombre de cellules N sur 10 petits rectangles (sur 2 diagonales) ;
- On compte le nombre de cellules n sur 1 rectangle $N/10$;
- Le volume de petit rectangle est de $0,01 \mu\text{l}$;

- On calcule le nombre de cellules sur toute la cellule (100 rectangles ou le grand rectangle) soit un volume total de 1 μl ($0,01 \mu\text{l} \times 100$) puis on rapporte au ml de la suspension.

Nombre de cellules /ml = $n \times 100 \times 10^3 = n \times 10^5$ (tenir compte du facteur de dilution).

2.3. Recherche de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar

2.3.1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

Les trois souches d'actinomycètes ont été testées par la méthode des cylindres d'agar (BASTIDE *et al.*, 1986), vis-à-vis de tous les germes cibles. Ce test consiste à ensemercer par inondation (250 μl) les trois souches d'actinomycètes standardisées (DO= 0,08 à 0,1 qui correspond à 10^6 - 10^7 UFC/ml) sur le milieu Bennett et incubées à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres de 6 mm de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Müller Hinton préalablement ensemençées (100 μl) avec les différentes bactéries cibles (nombre de répétition est de deux). Les boîtes sont incubées à 37°C/24h après un passage de 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des molécules dans le milieu. Les diamètres d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle.

2.3.2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Les trois souches d'actinomycètes ont été testées via la méthode des cylindres d'agar (BASTIDE *et al.*, 1986). Les trois souches d'actinomycètes sont standardisées (DO= 0,08 à 0,1 qui correspond à 10^6 - 10^7 UFC/ml), ensemençées sur le milieu Bennett (250 μl) et incubées à 28°C pendant 3 jours. Des cylindres de 6 mm de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte-pièce, puis déposés sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Sabouraud préalablement ensemençées avec les différentes souches fongiques tests (nombre de répétition est de deux). Les boîtes sont incubées à 28°C/72h après un passage de 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des molécules dans le milieu. Les diamètres d'inhibition sont mesurés à l'aide d'une règle.

3. Extraction des substances bioactives avec des solvants organiques

3.1. Culture en milieu liquide

50 ml du milieu Bennett liquide sont préparés dans des Erlenmeyers de 50 ml de volume, une colonie de chaque souche d'actinomycètes est ensemençée dans chaque Erlenmeyer. Les précultures sont incubées dans une étuve à 28°C et agitées en alternance avec un agitateur

magnétique pendant 72 heures. Chaque préculture est entièrement versée dans un autre Erlenmeyer de 500 ml contenant 300 ml de milieu Bennett liquide. Ces nouvelles cultures sont, également, incubées à 28°C et agitées en alternance pendant 7 jours (BOUDEMAGH, 2007).

3.2.Extraction à partir du culot

Après 7 jours d'incubation, les cultures sont centrifugées à 5000 g pendant 15 min, le mycélium présent dans le culot est lavé deux fois avec de l'eau distillée stérile. Le volume du culot est traité pendant 12 heures environ sous agitation alternée à température ambiante, avec cinq volumes de méthanol. Après agitation, la solution obtenue est centrifugée à 5000 g pendant 5 min. Ces extraits méthanoliques sont concentrés par évaporation sous la hotte à une température ambiante jusqu'à obtention de 1/4 du volume initiale (figure 22).

3.3.Extraction à partir du surnageant

Différents 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 : l'acétate d'éthyle et le chloroforme. La quantité de surnageant obtenue pour chaque culture est divisée en deux. Le volume du solvant ajouté est le même que celui de la fraction du surnageant.

Après séparation des phases dans des ampoules à décanter, les phases organiques obtenues pour chaque souche ont été concentrées par évaporation sous une hotte à température ambiante, jusqu'à obtention de 1/4 du volume initiale (figure 23).

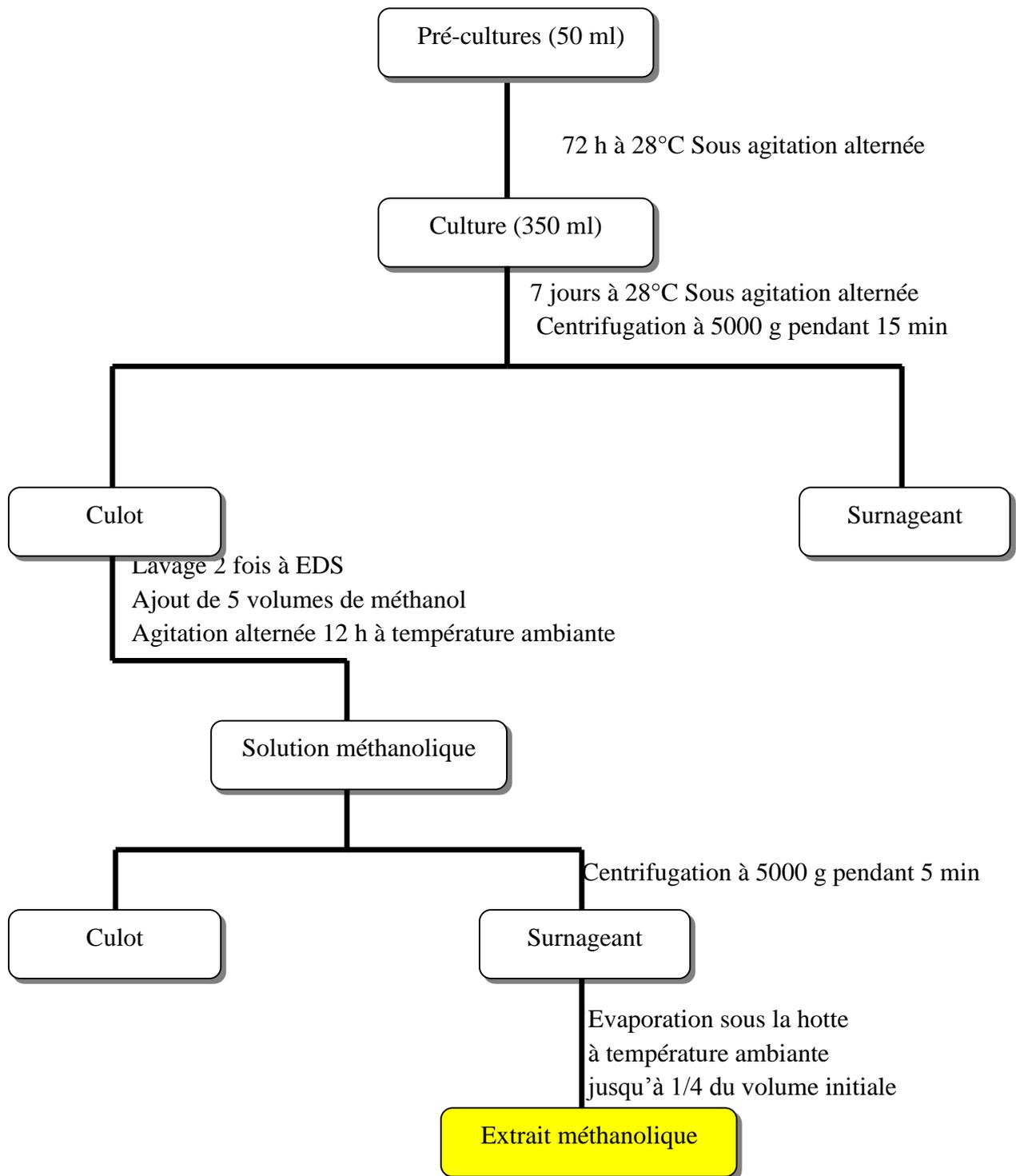


Figure 22 : Protocole d'extraction des molécules bioactives à partir du culot (BOUDEMAGH, 2007).

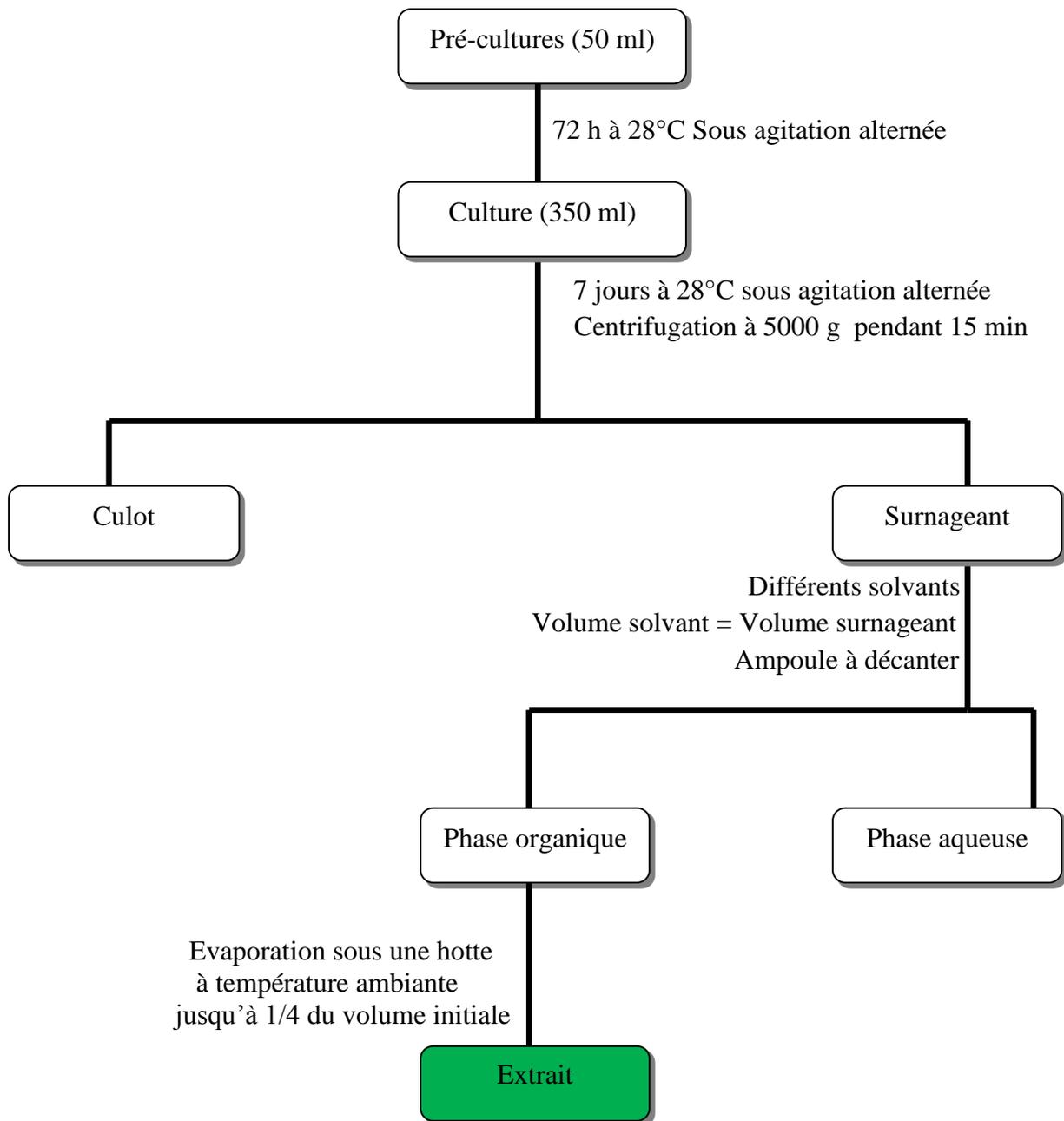


Figure 23 : Protocole d'extraction des molécules bioactives à partir du surnageant (BOUDEMAGH, 2007).

4. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits (technique des disques en papier)

L'activité antimicrobienne des extraits a été déterminée par la méthode de diffusion sur gélose décrite par OUELHADJ *et al.* (2014). Des disques en papier Wathman de (6 mm de

diamètre) sont imprégnés avec 15 µl de chaque extrait. Ces disques sont séchés à température ambiante, ensuite déposés à la surface du milieu Müller Hinton, préalablement, ensemencés (100 µl de l'inoculum standardisé) par les bactéries tests et étalés avec un râteau. D'autres disques sont déposés à la surface du milieu Sabouraud, préalablement, ensemencé (100 µl de l'inoculum standardisé) par les souches fongiques tests et étalé avec un râteau.

Les boîtes sont préalablement incubées à 4°C pendant 2 heures, pour une bonne diffusion des substances puis incubées à 28°C pour les souches fongiques et à 37°C pour les bactéries. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après 24 heures d'incubation pour les bactéries et après 3 jours pour les mycètes (LEMRISS *et al.*, 2003).

D'après MOREIRA *et al.* (2005), la sensibilité des bactéries cibles envers les différents composés est classée selon les diamètres des halos d'inhibition : $\emptyset < 8$ mm : bactérie non sensible ; $9 < \emptyset < 14$ mm : bactérie sensible ; $15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible et $\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible.

5. Etude de la stabilité des extraits

Après extraction des fractions actives, leur stabilité a été étudiée en fonction de certains critères physicochimiques (pH et température). Après chaque test, l'activité est testée par la méthode des disques en papier sur les germes cibles ayant montrés une sensibilité.

5.1.Effet du pH

Des fractions des extraits sont ajustées à des pH de 3, 7 et 11, ensuite testées par la méthode des disques en papier (BADJI *et al.*, 2006).

5.2.Effet de la température

D'autres fractions des extraits ont subi un traitement thermique : 4°C pendant 3 jours. Elles sont testées par la méthode des disques en papier (BADJI *et al.*, 2006).

6. Analyse statistique

L'analyse statistique a été réalisée par le logiciel STATISTICA version 7.1 en utilisant le test de l'analyse de la variance (ANOVA) à un facteur. Ce test nous permet de vérifier si les échantillons sont issus de la même population ou présentent des différences significatives.

RÉSULTATS

ET

DISCUSSION

1. Etude morphologiques, physiologiques et biochimiques des trois souches

1.1.Morphologie

1.1.1. Macromorphologie

Les analyses morphologiques sont importantes en taxonomie microbienne, elles sont généralement faciles à étudier et sont bien significatives vu que les critères morphologiques dépendent de l'expression de gènes qui sont souvent génétiquement stables. Un milieu de culture a été utilisé : le milieu Bennett. Ce milieu est généralement utilisé pour les bactéries actinomycètes et le genre *Streptomyces* (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966). Une observation de l'envers de la boîte permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat.

D'après les résultats présentés dans le tableau XV, nous pouvons déduire que :

- Les souches S2, S3 présentent une croissance et une sporulation abondantes sur le milieu Bennett sauf pour la souche S1 (R1).
- Le mycélium aérien et végétatif présentent des colorations très variées, on retrouve du jaune, blanc, vert grisâtre, beige.
- Les pigments solubles et mélanoides ne sont pas produits sur le milieu utilisé.

Tableau XV : Caractéristiques macromorphologiques des souches S1, S2 et S3.

Souche	Plan	Elévation	Bord	Couleur du MA	Couleur du MS	Aspect de la colonie
Souche S1	Filamenteuse	Bossue	Filamenteux	Blanc virant vers le marron	Brun	Poudreux et opaque
Souche S2	Circulaire	Bombée	Régulier	-	Jaune	Pâteux, brillant et opaque
Souche S3	Filamenteuse	Bombée	Filamenteux	Vert grisâtre	Beige	Poudreux et opaque

MA : Mycélium aérien, MS : Mycélium de substrat, (-) : absence de coloration.

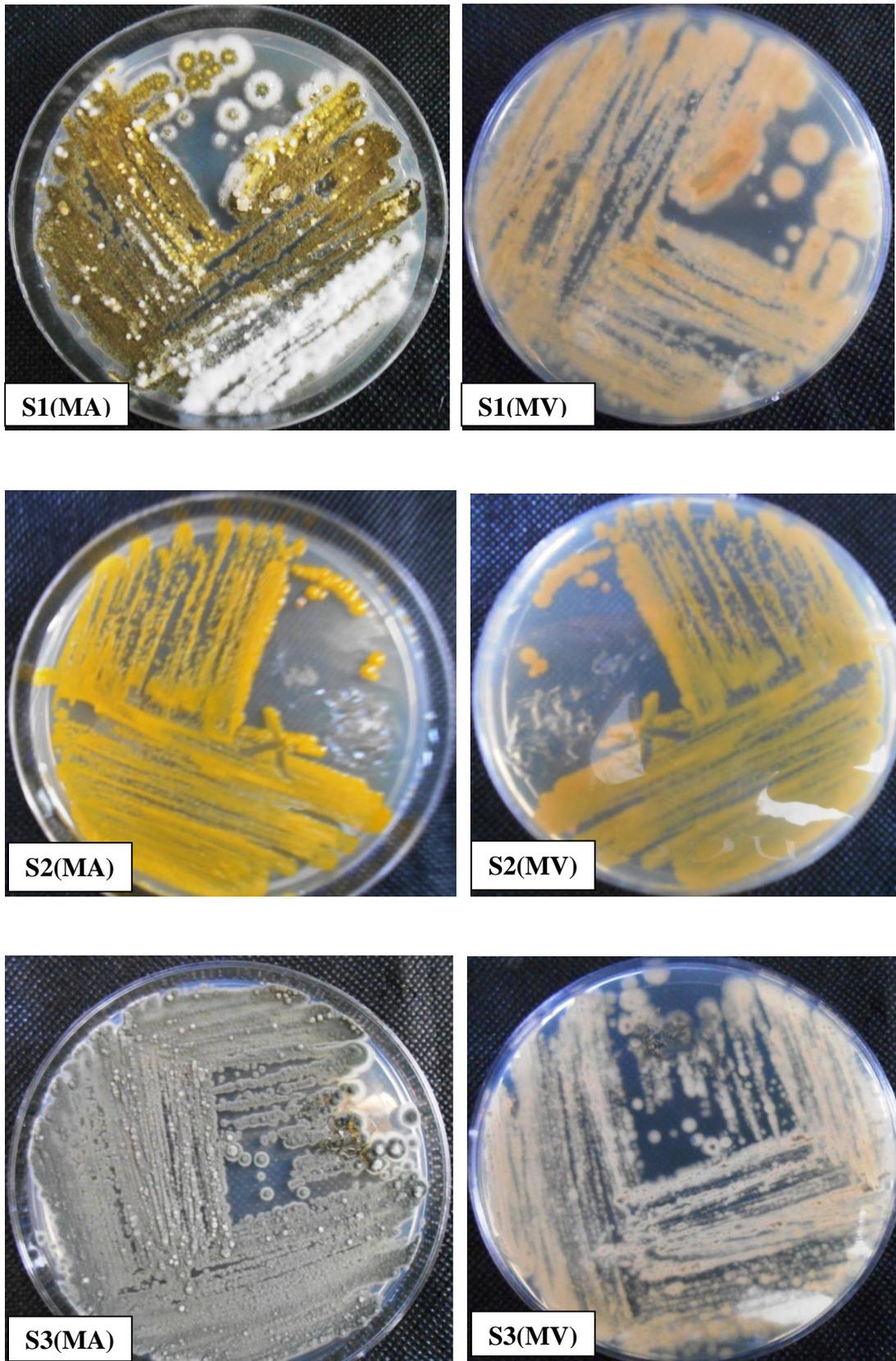


Figure 24 : Aspect du mycélium végétatif et du mycélium aérien des souches d'actinomycètes sur milieu Bennett.

Les caractéristiques morphologiques des colonies suggèrent qu'il s'agit bien de souches actinomycétales ; en effet les colonies apparaissent rugueuses, rondes à contours irréguliers, avec un aspect poudreux ou non, colorées ou non (figure 24).

1.1.2. Micromorphologie

Les observations microscopiques et la coloration de Gram montrent la présence de mycélium et de spores.

L'observation au microscope optique des mycéliums aériens des souches met en évidence des hyphes non septés et des chaînes de spores portées à l'extrémité des hyphes qui sont droites. Les spores sont cylindriques, arrondies et ne présentent aucune mobilité.

Tableau XVI : Aspect microscopique des trois souches d'actinomycètes.

Souches	Fragmentation	Sporulation	Forme de la spore
S1	-	-	-
S2	-	+	Cylindrique
S3	-	+	Arrondie

+ : Présence ; - : Absence.

- Résultat de la coloration de Gram

Toutes les souches testées sont Gram positives comme le montre les photos ci-dessous.

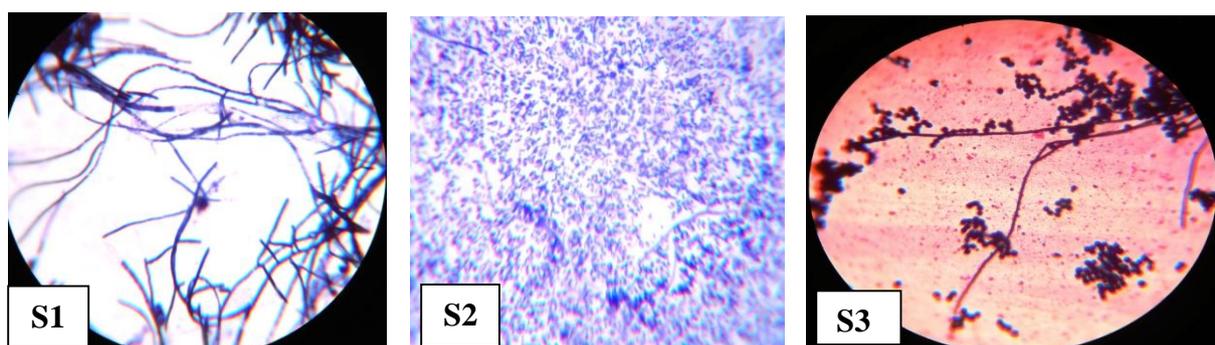


Figure 25 : Observation des souches S1, S2 et S3 (G× 1000) après coloration de Gram.

1.2. Physiologique et biochimique

Dans le but de mieux caractériser les trois souches d'actinomycètes, quelques caractères physiologiques et biochimiques ont été étudiés (tableau XVII).

Tableau XVII : Quelques Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales.

Caractéristiques	T	Souches		
		S1	S2	S3
Source de carbone				
Glucose	-	ND	+	+
Lactose	-	ND	+	+
Saccharose	-	ND	+	+
Citrate	-	ND	+	-
Mannitol	-	ND	+	+
Recherche de la β-galactosidase	-	ND	+	+
Recherche de l'oxydase	-	ND	+	+
Recherche de la catalase	-	ND	+	+
Réduction des nitrates	-	ND	-	+
Production d'H₂S	-	ND	-	-
Production de gaz	-	ND	-	-
Mobilité	-	ND	-	-
Voie d'attaque des glucides	-	ND	Oxydatif	Oxydatif/Fermentaire
Réaction avec le rouge de méthyle	-	ND	-	-
Réaction de Voges-Proskauer	-	ND	-	-
Production de l'indole	-	ND	-	-
Hydrolyse de l'amidon	-	+	-	+
Hydrolyse de la caséine	-	+	+	+
Coagulation du lait écrémé	-	-	-	-
Peptonisation du lait écrémé	-	-	+	+

(-) : Test négatif, (+) : Test positif, (T) : Témoin, (ND) : Non déterminer

Les deux souches actinomycétales cultivées se développent sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception de S3 qui n'a pas pu utiliser le citrate, l'hydrolyse de l'amidon a été observée que chez S1 et S3 (figure 26). Elles montrent un métabolisme protéique important, car toutes les souches hydrolysent la caséine (figure 27). Elles ont une action représentée par une peptonisation du lait écrémé sauf pour la S1 qui reste sans action (figure 28).

Elles ne produisent pas d'indole. La souche S3 réduit les nitrates en nitrites, mais pas la souche S2, par contre elles sont catalase et oxydase positive. Elles ne sont pas mobiles, la production de H₂S et de gaz n'est pas observée chez les deux souches.



Figure 26 : Hydrolyse de l'amidon par les souches d'actinomycètes S1 et S3.

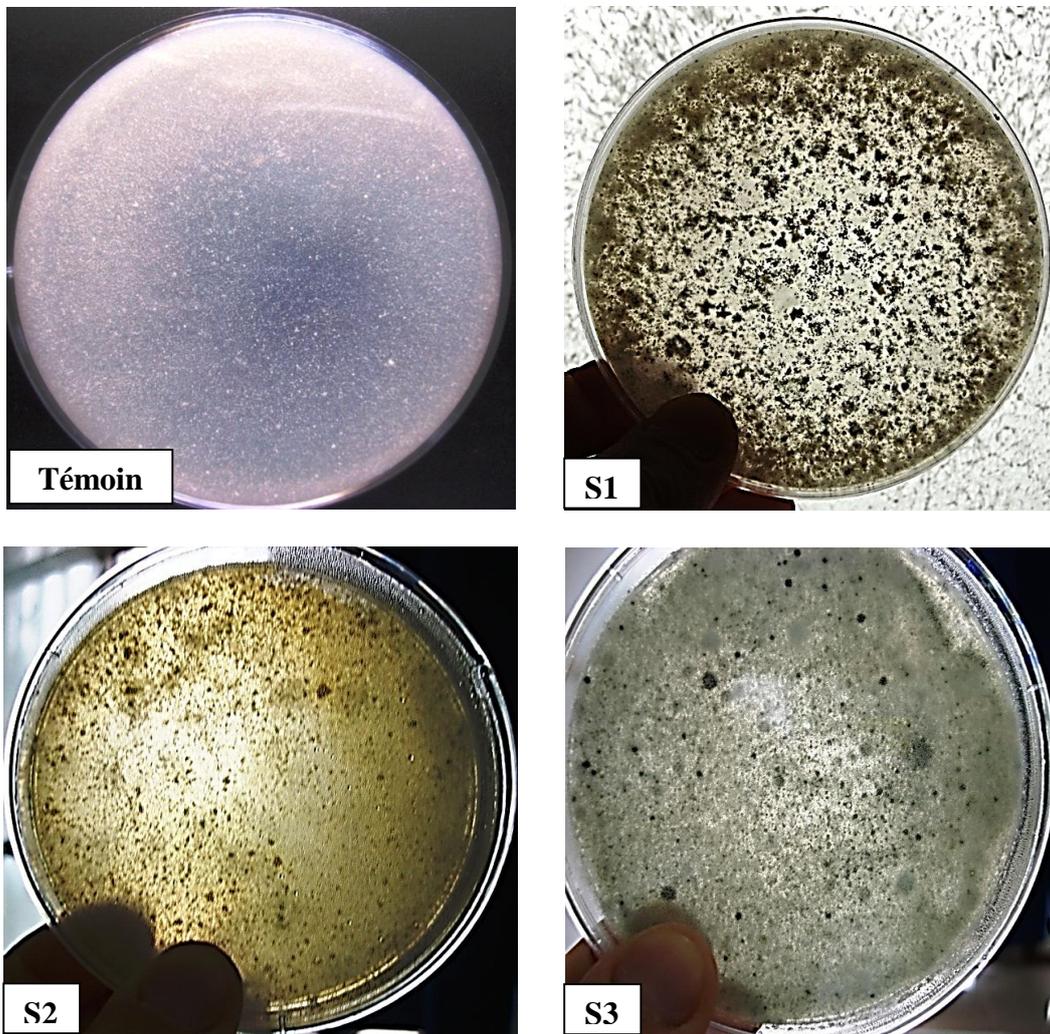


Figure 27 : Hydrolyse de la caséine par les souches actinomycétales S1, S2 et S3.

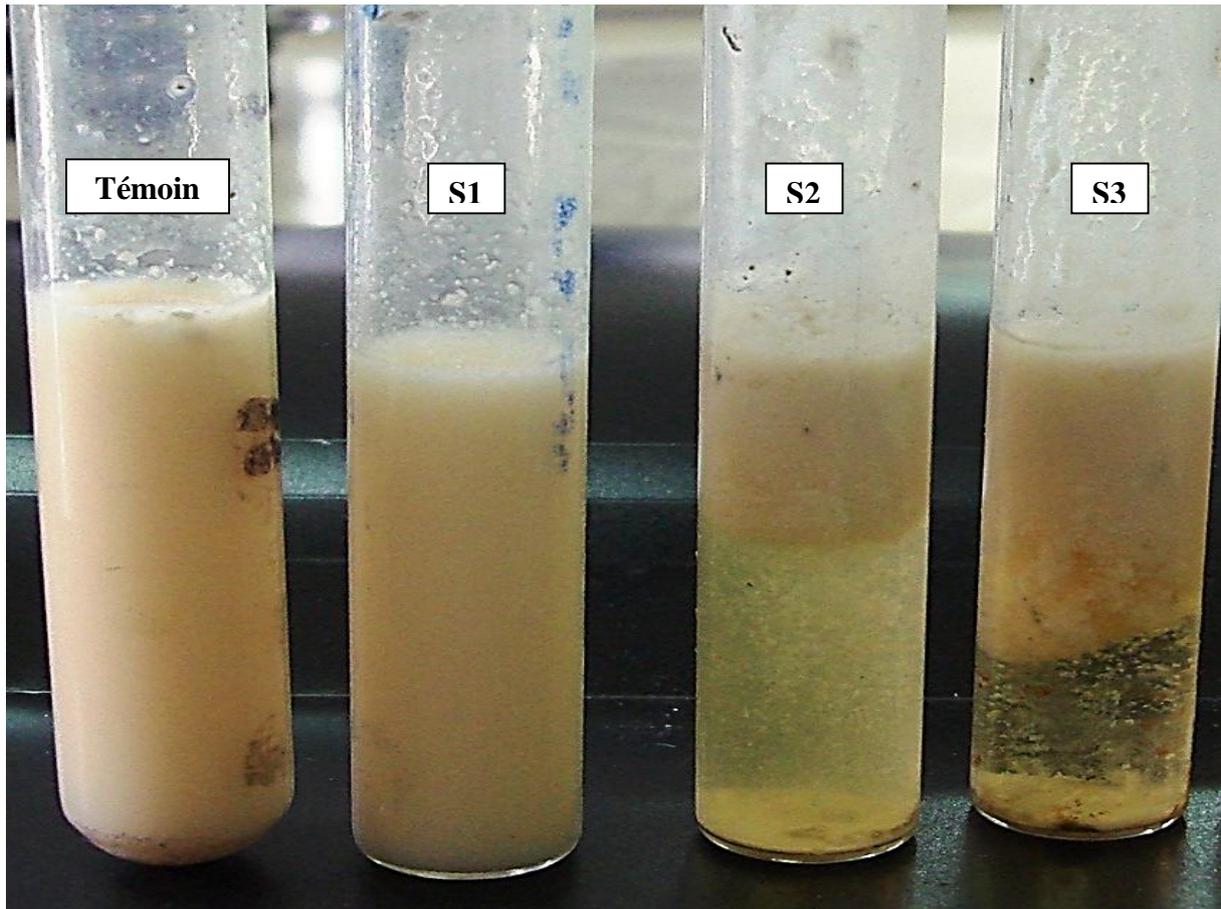


Figure 28 : Effet des trois souches d'actinomycètes S1, S2 et S3 sur le lait écrémé.

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes.

En effet, plusieurs auteurs s'accordent sur un profil macromorphologique plus ou moins général concernant la mise en évidence des actinomycètes : colonies circulaires, le plus souvent sèches, d'aspect fongique, parfois duveteuses, le diamètre des colonies est compris entre 1 et 4 mm, et dont la croissance est relativement lente comparativement aux bactéries (OTTOW et GLATHE, 1968 ; LARPENT et SANGLIER, 1989 ; PERRY *et al.*, 2004 ; KITOUNI, 2007 ; DJABLAH, 2010).

Cependant, il existe de nombreuses espèces d'actinomycètes qui ne cadrent pas forcément avec ce profil. De nombreuses espèces d'actinomycètes produisent par exemple des colonies de consistances crémeuses (ex. genres *Corynebacterium*, *Microbacterium*, etc.) voire grasses (ex. genres *Bogoriella*, *Actinomyces*, etc.), dont la plupart ne laissent entrevoir à l'œil nu aucun indice quant à la présence ou non de mycélium (BERGEY'S MANUAL, 2012).

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 identifiés avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (WILLIAMS *et al.*, 1993).

La plupart des souches développent des colonies après 48 heures d'incubation, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide, en effet NODWEL et LOSICK (1998) ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être donc rapprochées au genre *Streptomyces*.

Après 7 jours de développement, le mycélium aérien présente une gamme de couleur assez variée : blanc, beige, jaune, marron, brun, gris ou vert. Ceci représente un critère de détermination du genre des *Streptomyces* (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966 ; WILLIAMS et WELLINGTON, 1982 ; SABAOU, 1998).

Toutes les souches développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien sauf pour la S2 qui présente un aspect crémeux. Le mécanisme de la morphogenèse a fait l'objet d'une étude réalisée par SPRUSANSKY *et al.* (2003) et KIM *et al.* (2005) sur *Streptomyces coelicolor*, il s'est avéré qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium du substrat, la libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes démontré par l'apparition d'un mycélium aérien.

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).

Les trois souches sont capables de métaboliser l'amidon (excepté S2) et la caséine du lait, pour assurer la source de carbone et d'azote.

D'après les tests morphologiques réalisés, nos souches seraient des actinomycètes qui se rapprocheraient plus du genre *Streptomyces*. En effet, LECHEVALIER et LECHEVALIER

(1967) ont montré que la fréquence de *Streptomyces* dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents est de 95,34 %.

Afin de déterminer les espèces des trois souches, l'étude morphologique, physiologique et biochimique ne suffit pas. Il est donc nécessaire de faire appel à d'autres techniques comme l'application des méthodes génétiques, telles que l'hybridation DNA-DNA et l'analyse des séquences du gène de l'ADNr 16S (LABEDA, 1992 ; KIM *et al.*, 1999).

2. Recherche de l'activité antimicrobienne par la méthode des cylindres d'agar

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 (1951) à partir de *Sreptomycetes 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 FERCHAU, 1968 ; HACENE *et al.*, 1994 ; CHIBA *et al.*, 1999 ; HWANG *et al.*, 2001 ; LEE et HWANG, 2002 ; MEKLAT *et al.*, 2011 ; SUELA SILVA, 2013).

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar. En effet, selon KITOUNI (2007) et BELYAGOUBI (2014) cette technique montre de meilleurs résultats comparativement à la technique des puits. D'après LOUCIF (2011), le diamètre des cylindres d'agar a un effet sur les résultats du test d'activité antimicrobien et il est préférable d'opter pour des cylindres de 6 mm de diamètre afin d'avoir des résultats reproductibles concernant le test d'activité antimicrobien.

C'est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Selon laquelle, nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les bactéries et les champignons tests utilisées.

Certains auteurs s'accordent que le milieu de culture Bennett est l'un des meilleurs milieux de production d'antimicrobiens pour l'ensemble des actinomycètes (BOUSSABER *et al.*, 2012 ; JIHANI, 2013).

Cette propriété s'explique d'avantage par le fait que le milieu Bennett est riche en substrats carbonés (comme le glucose) et en substrats azotés (casaminoacides, extrait de levure et extrait de viande) (LOUCIF, 2011).

Selon PARK *et al.* (1994) le glucose est généralement la meilleure source de carbone et d'énergie pour la croissance de nombreux microorganismes producteurs d'antibiotiques, en l'occurrence les actinomycètes.

D'après les travaux accomplis par LOUCIF (2011), le pourcentage le plus élevé des souches actives (11/19 souche soit 57,89 %), et la plus grande moyenne des diamètres des zones d'inhibition (22,42 mm) ont été obtenue à partir du milieu de culture Bennett.

Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose, permet après incubation de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

Les diamètres des zones d'inhibition des bactéries, de *Candida albicans* et *Aspergillus niger* testés sont résumés dans les tableaux XVIII et XIX.

Un antibiotique standard (Oxytétracycline) est testé sur six souches bactériennes Gram (+) et Gram (-), nous avons observé que les différentes souches étaient sensibles à cet antibiotique. Plus un antifongique (Amphotéricine B) testé sur les deux souches fongiques qui s'est montré actif.

A partir des résultats mentionnés dans les tableaux ci-dessous, les trois souches testées ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un des germes cibles testés, à l'exception de *C. albicans* qui demeure résistants aux trois souches étudiées.

Les mesures des halos d'inhibition (diamètre du disque inclus) nous ont permis de classer les microorganismes suivant leur degré de sensibilité aux différentes souches d'actinomycètes :

- $\emptyset < 8$ mm : bactérie non sensible ;
- $9 < \emptyset < 14$ mm : bactérie sensible ;
- $15 < \emptyset < 19$ mm : bactérie très sensible ;
- $\emptyset > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible (MOREIRA *et al.*, 2005).

Tableau XVIII : Activité antibactérienne des trois souches d'actinomycètes déterminée par la méthode des cylindres d'agar (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Bactéries-tests	T ⁺ (O)	T ⁻	Souches actinomycétales		
			S1	S2	S3
<i>Staphylococcus aureus</i>	25	++	*6±00	6±00	10,75±0,35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	17,5	++	9,5±4,95	11±00	13,25±0,35
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	24,5	++	6±00	9,75±1,06	6±00
<i>Escherichia coli</i>	25	++	9,75±1,06	14,75±3,89	11,5±0,7
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC43300)	32,5	++	22,25±1,77	06±00	6±00
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	25	++	18,75±1,06	11,75±0,35	19,75±3,88

T⁺ (O) : Oxytétracycline ; * : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des cylindres d'agar) ; ++ : Tapis microbien ; T⁻ : Témoin négatif.

Tableau XIX : Activité antifongique des trois souches d'actinomycètes déterminée par la méthode des cylindres d'agar. (Diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Champignons-tests	T ⁺	T ⁻	Souches actinomycétales		
			S1	S2	S3
<i>Aspergillus niger</i>	22	++	16,25±1,06	6±00	19,5±1,4
<i>Candida albicans</i>	20	++	*6±00	6±00	6±00

Antifongique (T⁺) : Amphotéricine B ; * : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des cylindres d'agar) ; ++ : Tapis microbien ; T⁻ : Témoin négatif.

Les valeurs représentent la moyenne de 2 mesures ± SD.

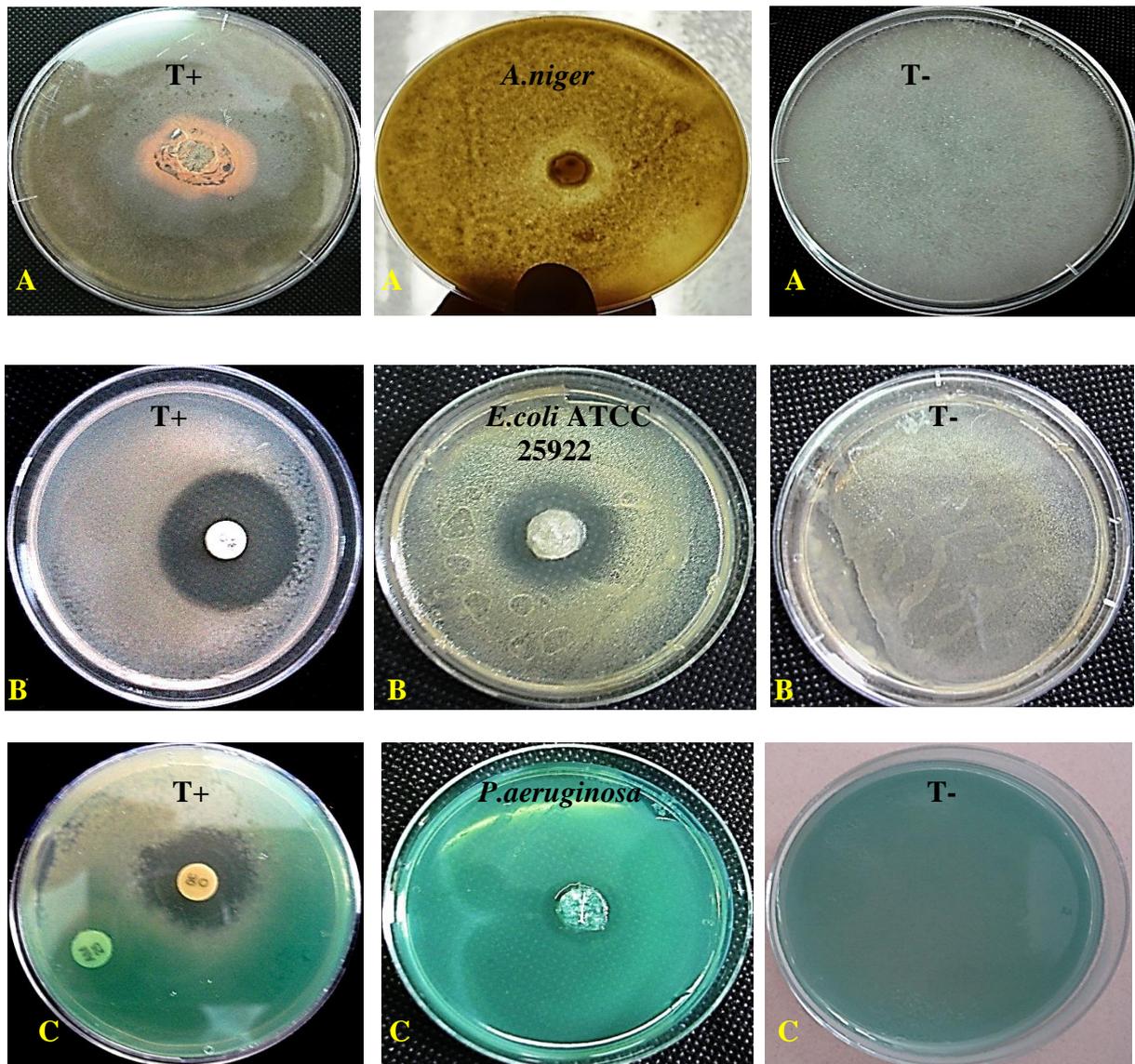


Figure 29 : Photos des tests d'activité antimicrobienne de la souche S1 vis-à-vis des souches tests : (A) *Aspergillus niger*; (B) *Escherichia coli* ATCC 25922 ; (C) *Pseudomonas aeruginosa* (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif).

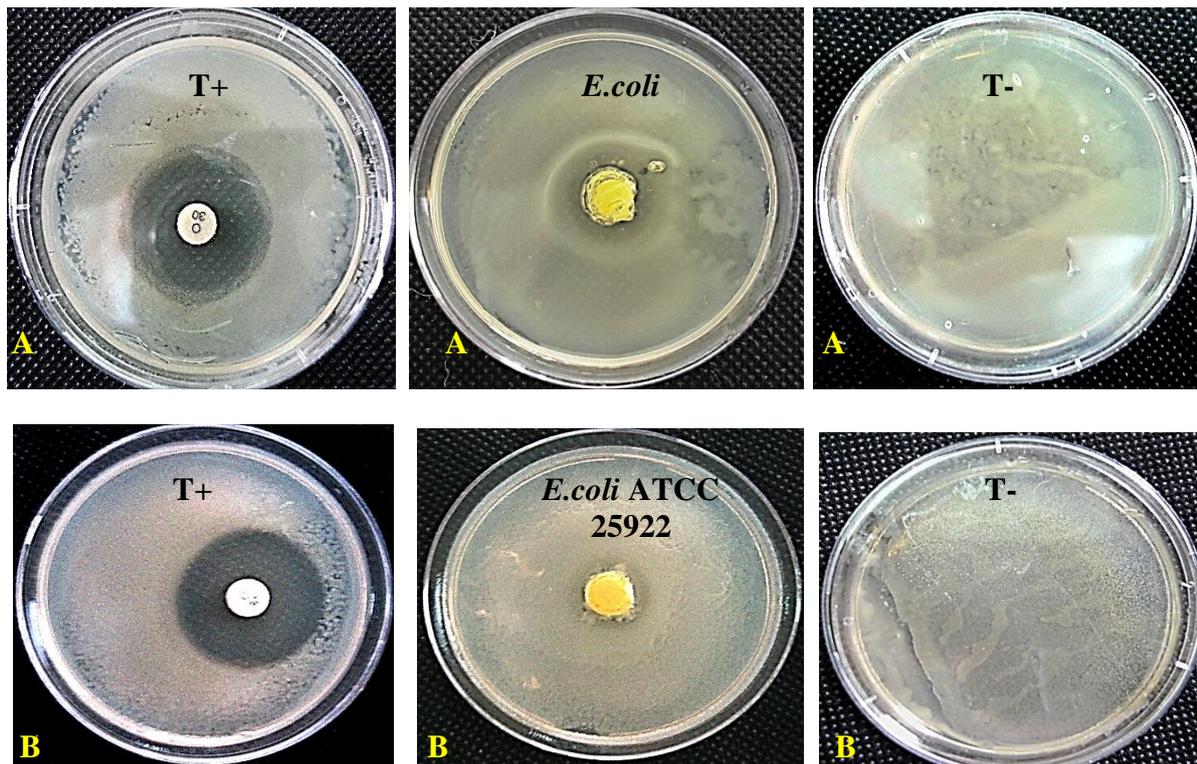


Figure 30 : Photos des tests d'activité antimicrobienne de la souche S2 sur les souches tests : (A) *Escherichia coli* ; (B) *Escherichia coli* ATCC 25922 (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif).

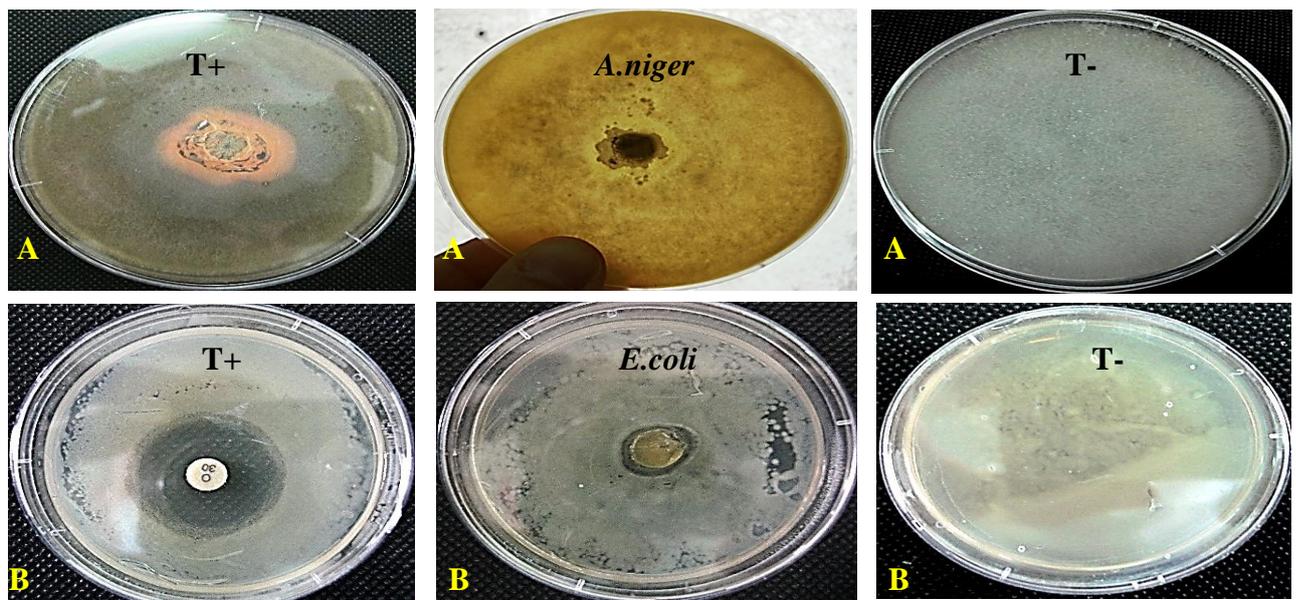


Figure 31 : Photos des tests d'activité antimicrobienne de la souche S3 vis-à-vis des souches tests : (A) *Aspergillus niger*; (B) *Escherichia coli* (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif).

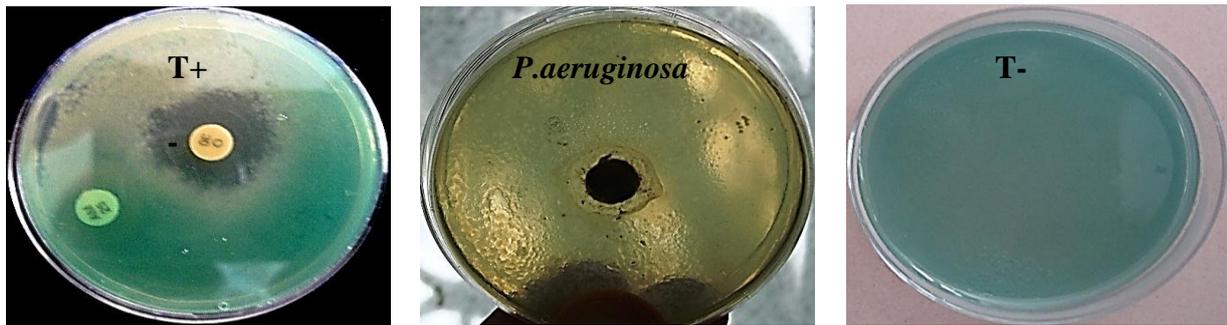


Figure 32 : Photo de test d'activité antimicrobienne de la souche S3 vis-à-vis de la souche test : *Pseudomonas aeruginosa* (T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif).

La figure (33) illustre les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les trois souches d'actinomycètes (S1, S2, S3) pour les différentes souches microbiennes testées.

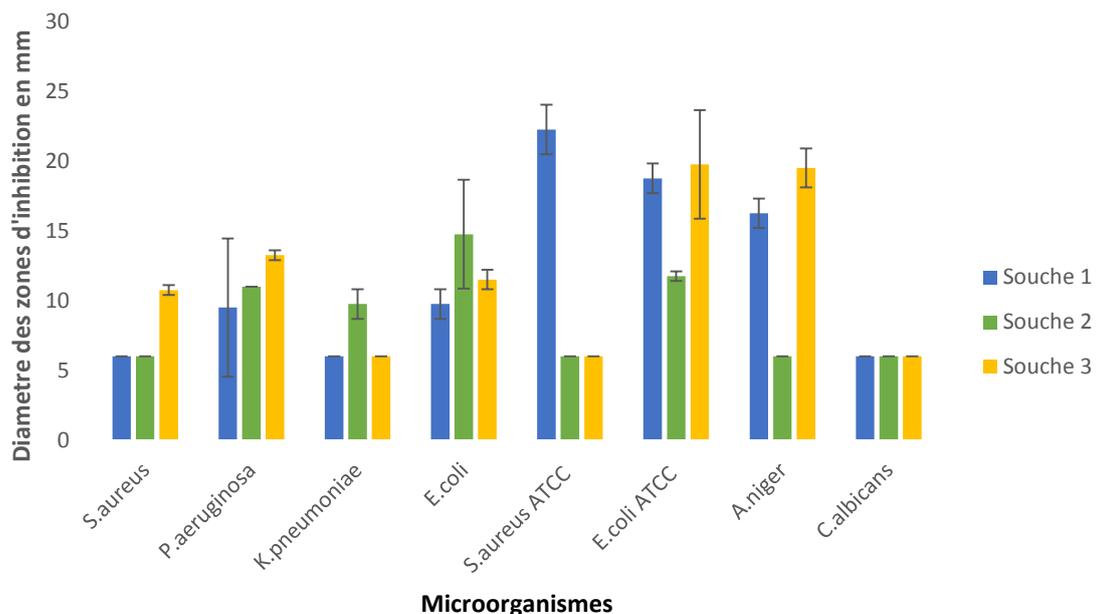


Figure 33 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les souches d'actinomycètes (S1, S2 et S3).

Dans le but de savoir s'il y'a une différence entre les zones d'inhibition des trois souches, nous avons effectué le test ANOVA qui a donné une p-value $> 0,05$, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative (effet antagoniste) entre les trois souches (voir tableau 1 de l'annexe 2).

2.1. Test d'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des trois souches d'actinomycètes sont illustrés dans le tableau XVIII.

Les résultats ont montré que la souche S1 présente un spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries à coloration de Gram positive et négative testées (*S.aureus* ATCC 43300, *P.aeruginosa*, *E.coli* et *E.coli* ATCC 25922) (figure 29). Cependant, elle n'est pas active contre *S.aureus* et *K.pneumoniae*.

Il ressort de cela que la souche S2 a montré une activité contre toutes les bactéries Gram négatif (*P.aeruginosa*, *K.pneumoniae*, *E.Coli* et *E.coli* ATCC 25922) (figure 30), mais elle reste inactive contre les bactéries Gram positif (*S.aureus* ATCC 43300 et *S.aureus*).

Du tableau XVIII, on remarque que la souche S3 a montré une activité contre les bactéries à coloration de Gram positive et négative (*S.aureus*, *P.aeruginosa*, *E.coli* et *E.coli* ATCC 25922) (figure 31 et 32). Tandis qu'elle ne révèle aucune activité antibactérienne détectée contre *K.pneumoniae* et *S.aureus* ATCC 43300.

La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec la souche S1 (22,25 mm) cultivée sur le milieu de culture Bennett contre la bactérie-test : *Staphylococcus aureus* ATCC 43300. LOUCIF (2011) a obtenu le même résultat avec la même bactérie-test dont le diamètre de la zone d'inhibition dépasse 20 mm, avec une souche actinomycétales cultivées sur le milieu de culture Bennett.

De même, nos résultats montre que *S. aureus* est résistante aux molécules sécrétées par les deux souches d'actinomycètes S1 et S2 (à l'exception de la souche S3). ŞAHIN et UCUR (2003), ont isolé des souches de *Streptomyces* du sol de la Turquie avec une activité vis-à-vis de *S. aureus* de 11 à 30 mm. Des souches d'actinomycètes de la même origine révèlent une inhibition entre 08 et 16mm (OSKAY *et al.*, 2004).

Les trois souches ont montré une activité inhibitrice contre *E.coli* avec des zones qui se situent entre 10mm et 20mm de diamètre. 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.

P.aeruginosa est inhibée par les trois souches étudiées avec des diamètres compris entre 9 mm et 14 mm. A l'encontre la résistance de cette dernière est observée dans plusieurs travaux (JIHANI, 2013 ; BELYAGOUBI, 2014), ce qui donne une importance particulière à ces trois souches.

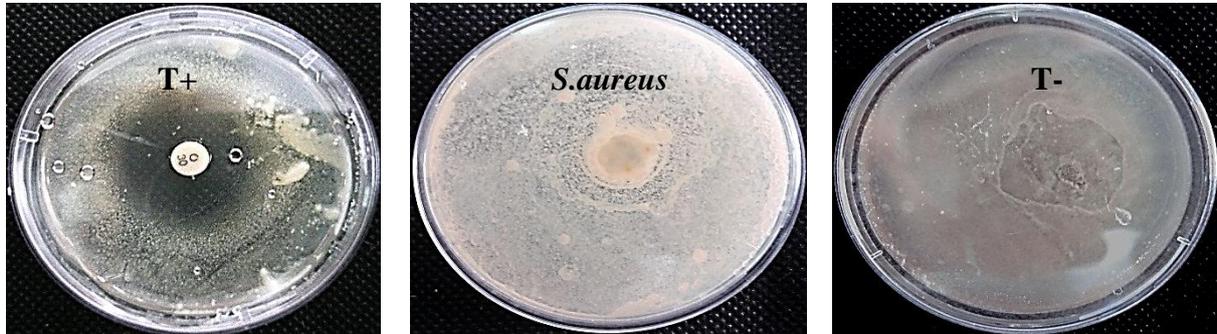


Figure 34 : Résistance de *Staphylococcus aureus* a la souche actinomycétale S1
(T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif).

2.2. Test d'activité antifongique

Les résultats du tableau XIX illustrent que les souches S1 et S3 ont montré une activité contre *A.niger* (figure 28 et 30) et restent inactives contre *C. albicans* (figure 35). Tandis que la souche S2 ne révèle aucune activité antifongique (figure 35).

Plusieurs études ont 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).

Il a été démontré que l'effet antagoniste qu'exercent les actinomycètes sur les champignons peut provenir de la production directe d'un antibiotique ou d'une enzyme dégradante (BAKER et COOK, 1974), ou de la production de substances volatiles inhibant la croissance des champignons (GUPTA et TANDON, 1977). Ça pourrait être l'une de ces molécules que les souches S1 et S3 ont synthétisées pour inhiber la croissance d'*Aspergillus niger*.

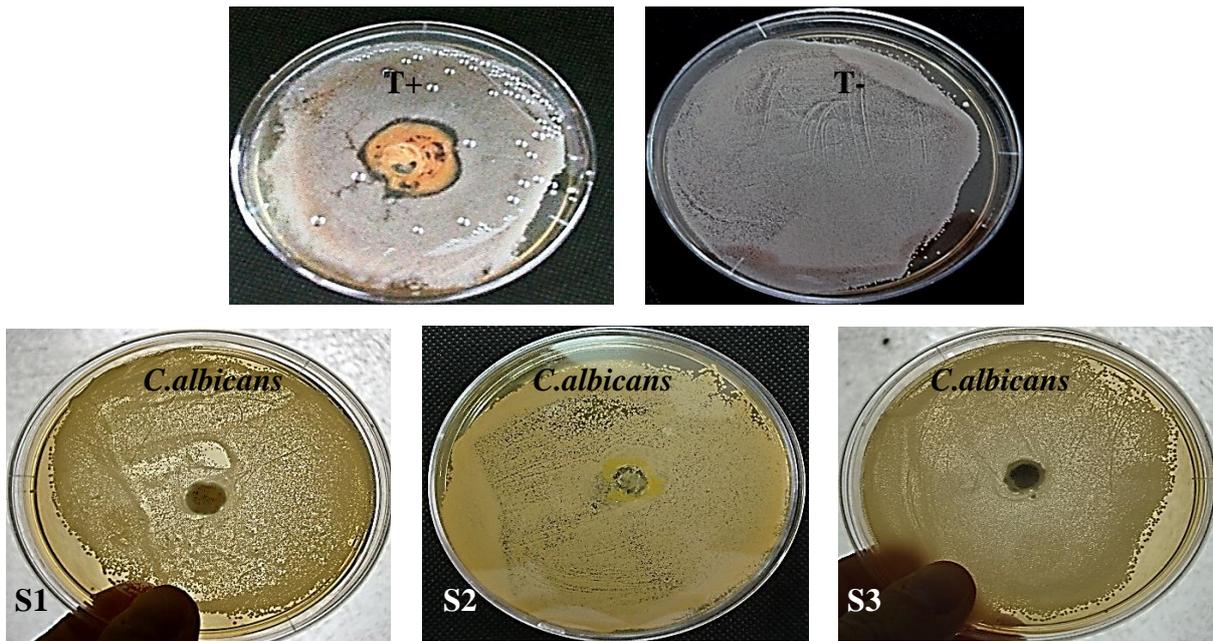


Figure 35 : Résistance de *Candida albicans* aux trois souches d'actinomycètes (S1, S2 et S3)
(T+ : témoin positif ; T- : témoin négatif).

Au bilan, les résultats figurés dans les tableaux XVIII et XIX nous permettent de conclure que, d'une part, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre (et d'autre part, pour la même souche actinomycétale, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre).

Les différences morphologiques entre les bactéries Gram positives et Gram négatives pourraient être responsables de leur différence de sensibilité. 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 positives, qui n'ont qu'une couche de peptidoglycane externe qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (JIHANI, 2013).

Ces variations de résultats du test d'activité antibactérienne s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antimicrobiennes et que la composition du milieu de culture (la nature et la concentration des composants) peut affecter cette production (KUSTER et WILLIAMS, 1964 ; TESIC et LUKIC, 1966 ; WAKSMAN, 1967 ; VALAN ARAZU *et al.*, 2008 ; SINGH *et al.*, 2009). Par exemple 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 l'istamycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (DEMAIN, 1989 ; PIEPERSBERG et DISTLER, 1997).

3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des extraits organiques

Trois solvants de polarité différente (l'acétate d'éthyle, le chloroforme et le méthanol) ont été utilisés pour extraire les molécules bioactives à partir du milieu de culture Bennett.

Le test d'activité contre les microorganismes-tests a été réalisé par la technique des disques en papier de 6 mm de diamètre.

Tableau XX : Activité antibactérienne des extraits organiques des trois souches d'actinomycètes déterminées par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Souches	Bactéries-tests	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i> ATCC	<i>E. coli</i> ATCC
	Solvant						
S1	Acétate d'éthyle	6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	6±00
	Chloroforme	*6±00	8,5±3,54	6±00	6±00	6±00	6±00
	Méthanol	6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	6±00
S2	Acétate d'éthyle	6±00	9,5±4,95	6±00	18,2±2,4	6±00	6±00
	Chloroforme	6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	10,7± 0,3
	Méthanol	6±00	6,25±0,35	6±00	6±00	6±00	6±00
S3	Acétate d'éthyle	6±00	6±00	6±00	6±00	6±00	8,5±3,53
	Chloroforme	8 ±2,82	6,25± 0,35	10±4,24	6±00	6±00	10,5±6,3
	Méthanol	6±00	6±00	6,5±0,71	6±00	6±00	6±00

* : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des disques en papier)

Tableau XXI: Activité antifongique des extraits organiques des trois souches d'actinomycètes déterminées par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Souches Actinomycétales	Souche fongique tests	<i>C.albicans</i>	<i>A.niger</i>
	Solvants		
S1	Acétate d'éthyle	6±00	6±00
	Chloroforme	6±00	6±00
	Méthanol	6±00	6±00
S2	Acétate d'éthyle	6±00	6±00
	Chloroforme	6±00	6±00
	Méthanol	6±00	6±00
S3	Acétate d'éthyle	6±00	6±00
	Chloroforme	6±00	6±00
	Méthanol	6±00	8,5±3,54

* : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des disques en papier)

Les figures (36, 37 et 38) illustrent les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les différents extraits organiques (acétate d'éthyle, chloroforme, méthanol) des trois souches d'actinomycètes (S1, S2, S3) respectivement, pour les différentes souches microbiennes testées.

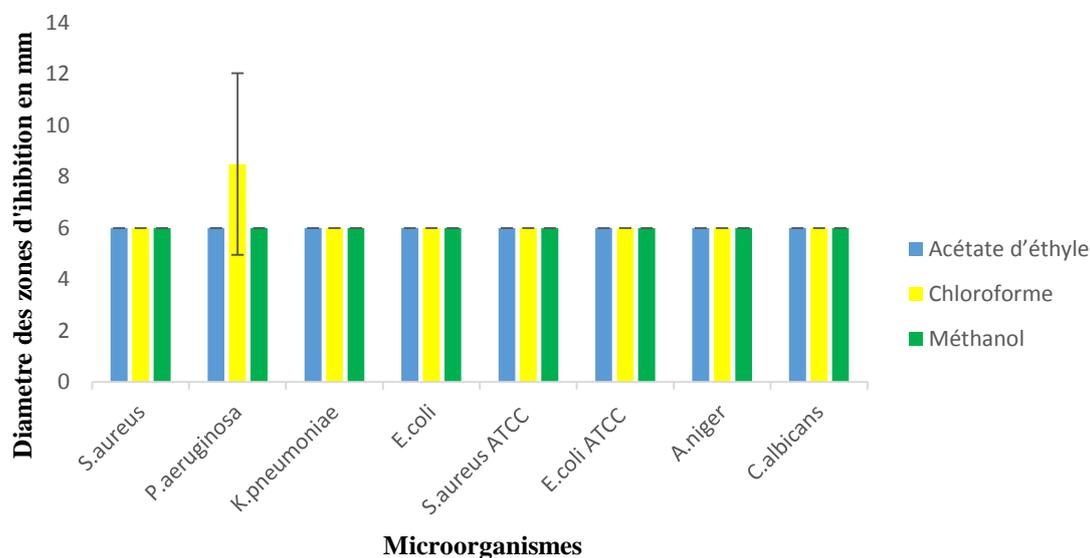


Figure 36 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les différents extraits organiques de la souche S1.

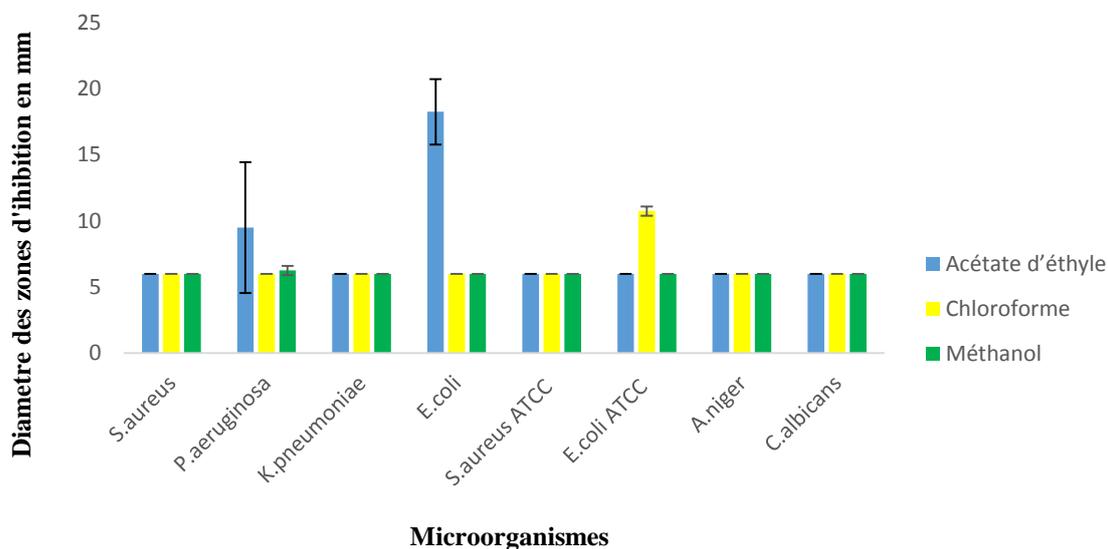


Figure 37 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les différents extraits organiques de la souche S2.

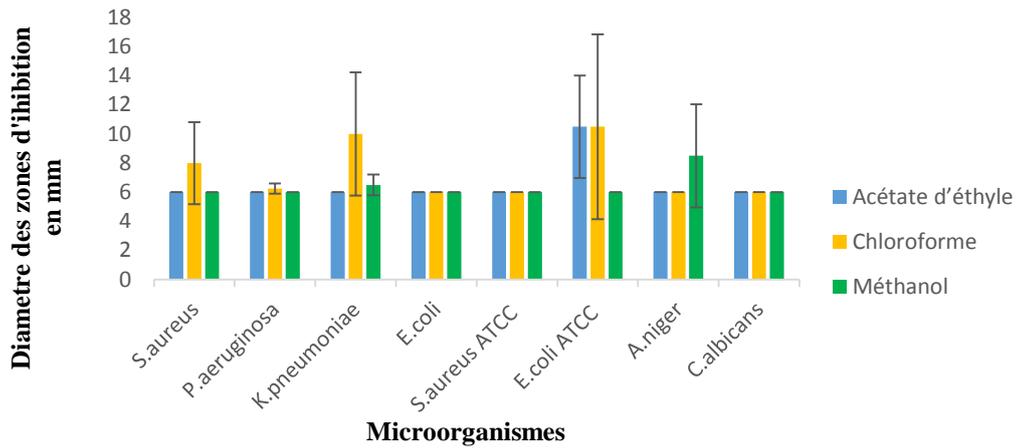


Figure 38 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition en (mm) exprimées par les différents extraits organiques de la souche S3.

Les figures ci-dessous illustrent la sensibilité et la résistance des différents microorganismes tests vis-à-vis des trois extraits organiques obtenus à partir des cultures liquides des trois souches d'actinomycètes (S1, S2 et S3).



Figure 39 : Effet de l'extrait chloroformique de la souche S1 sur *Pseudomonas aeruginosa* (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme).



Figure 40 : Résistance de *Klebsiella pneumoniae* à l'extrait chloroformique de la souche S1 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme).

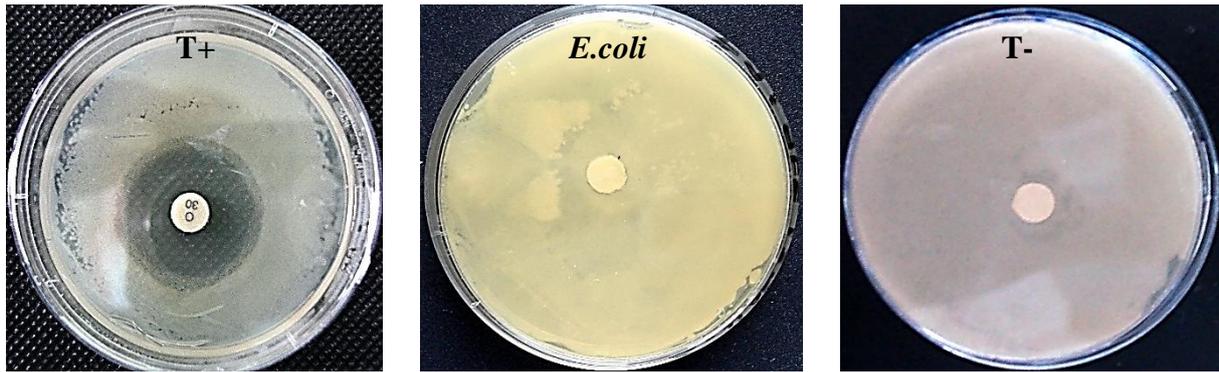


Figure 41 : Résistance d'*Escherichia coli* à l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S1 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle).



Figure 42 : Résistance de *Staphylococcus aureus* à l'extrait méthanolique de la souche S1 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatif réalisé avec le méthanol).

Pour la souche S1, on a noté qu'une seule sensibilité des souches tests, qui est rencontrée chez *Pseudomonas aeruginosa* avec une zone d'inhibition de $8,5 \pm 3,54$ pour l'extrait chloroformique comme le montre la figure 40. Les autres souches tests demeurent résistantes aux différents extraits organiques (figure 41, 42, 43 et tableau XX, XXI).



Figure 43 : Effet de l'extrait chloroformique de la souche S2 sur *Escherichia coli* ATCC (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le chloroforme).

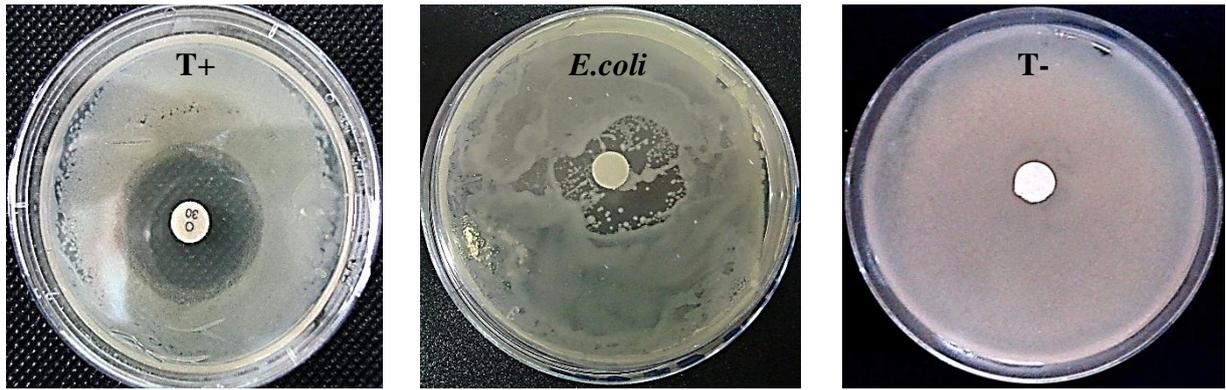


Figure 44 : Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur *Escherichia coli* (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatif réalisés avec l'acétate d'éthyle).



Figure 45 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la souche S2 sur *Pseudomonas aeruginosa* (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle).

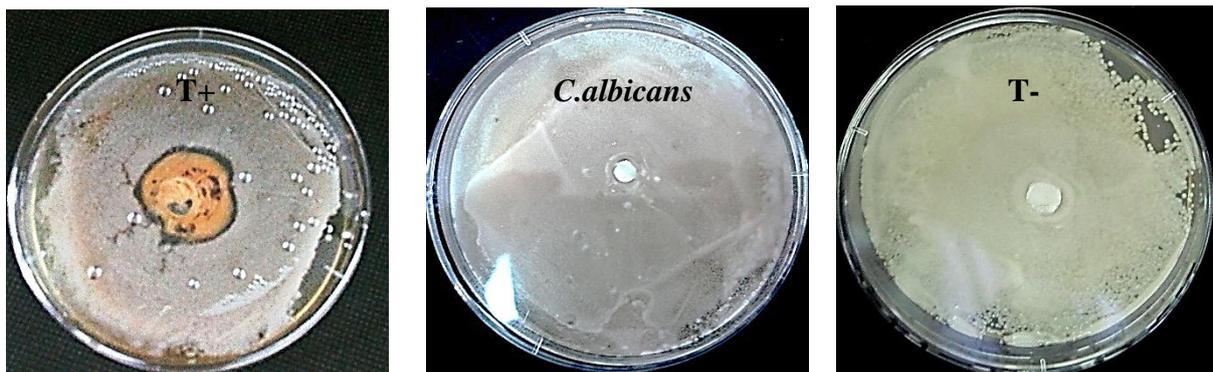


Figure 46 : Résistance de *Candida albicans* à l'extrait chloroformique de la souche S2 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme).

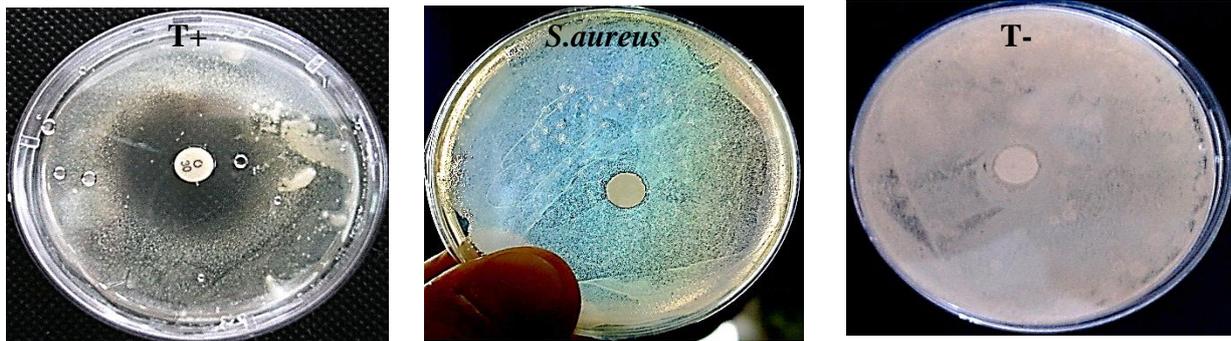


Figure 47 : Résistance de *Staphylococcus aureus* à l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S2 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle).



Figure 48 : Résistance d'*Aspergillus niger* à l'extrait méthanolique de la souche S2 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le méthanol).

Les extraits organiques obtenus à partir de la culture de la souche S2 ont été tous testés pour leurs activités antifongiques et antibactériennes. Certains n'ont montré aucune activité anticellulaire, d'autres sont actifs. On a constaté une activité de l'extrait obtenu à partir de l'acétate d'éthyle contre *P.aeruginosa* ($\text{Ø} = 13 \text{ mm}$) (figure 45) et *E. coli* ($\text{Ø} = 16,5 \text{ mm}$ et 20 mm) (figure 44). Pour l'extrait méthanolique on a constaté une légère activité vis-à-vis de *P.aeruginosa* ($\text{Ø} = 6,5 \text{ mm}$). L'extrait chloroformique a une action seulement sur *E. coli* ATCC 25922 ($\text{Ø} = 11$ et $10,5 \text{ mm}$) (figure 43).

Le restant des souches tests demeurent toutes résistantes aux différents solvants organiques, comme le montrent les figures (46, 47 et 48) et les tableaux (XX et XXI).

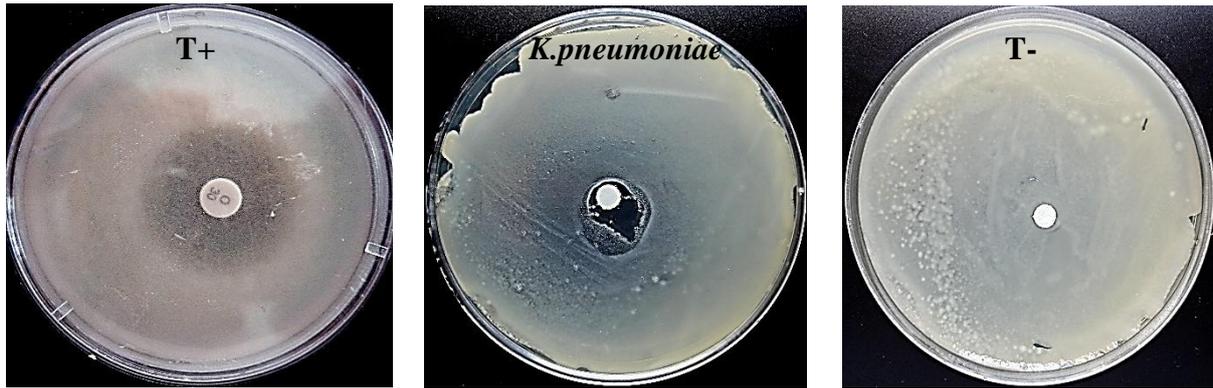


Figure 49 : Effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur *Klebsiella pneumoniae* (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme).



Figure 50 : Effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur *Staphylococcus aureus* (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme).



Figure 51 : Effet de l'extrait acétate d'éthyle de la souche S3 sur *Escherichia coli* ATCC (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle).



Figure 52 : Effet de l'extrait méthanolique de la souche S3 sur *Aspergillus niger*
(T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le méthanol).

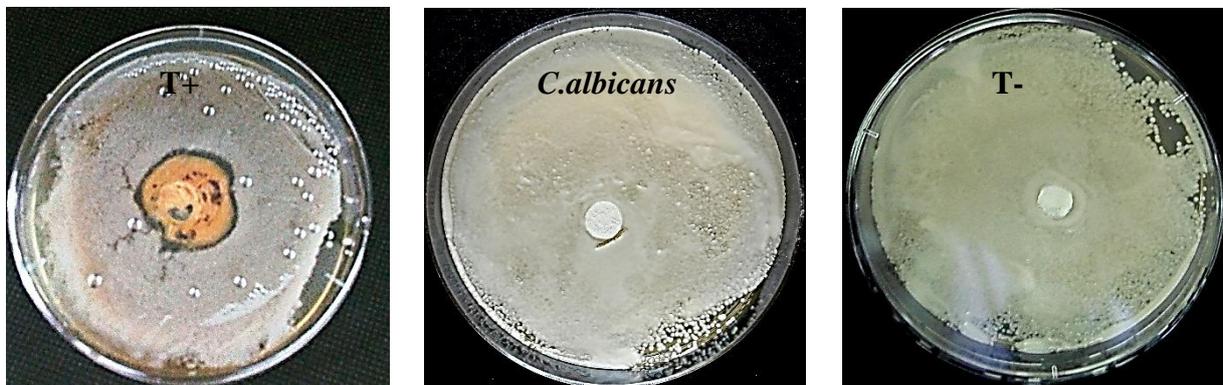


Figure 53 : Résistance de *Candida albicans* à l'extrait chloroformique de la souche S3
(T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec le chloroforme).



Figure 54 : Résistance de *Staphylococcus aureus* ATCC à l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche S3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoin négatif réalisé avec l'acétate d'éthyle).

En ce qui concerne la souche S3, les résultats ont montré que les trois fractions ont un effet inhibiteur au moins sur une souche test. L'extrait à l'acétate d'éthyle a un effet inhibiteur sur *E.coli* ATCC 25922 ($\varnothing = 11$ mm) (figure 51). La fraction méthanolique a montré une action positive contre *A.niger* ($\varnothing = 11$ mm) (figure 52) et *K.pneumoniae* ($\varnothing = 7$ mm). L'extrait chloroformique a montré une activité plus large vis-à-vis de *S.aureus* ($\varnothing = 10$ mm) (figure 50), *P.aeruginosa* ($\varnothing = 6,5$ mm), *K.pneumoniae* ($\varnothing = 13$ mm et 8,5 mm) et *E.coli* ATCC 25922 ($\varnothing = 15$ mm).

Les autres souches testées avec les fractions organiques n'ont pas montré de sensibilité comme le montre les figures 53, 54, et les tableaux XX, XXI.

Le test de l'ANOVA a donné une p-value $> 0,05$, donc statistiquement il n'existe pas de différence significative, c'est-à-dire que la nature du solvant utilisé n'influence pas le diamètre des zones d'inhibition, c'est-à-dire l'activité antimicrobienne (voir tableau 2, 3 et 4 de l'annexe 2).

L'action positive de la souche S1 (extrait chloroformique) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* (souche résistante isolée du CHU de Tizi-Ouzou) attire notre attention. Une étude mérite selon nous, d'être approfondie dans des travaux avenir. Ce genre de bactéries sont redoutables dans les hôpitaux et causent des infections nosocomiales mortelles. En effet, la vancomycine considérée comme la molécule de dernière ligne dans le traitement des infections staphylococciques devient dans ces cas inactive. Des travaux récents, publiés dans la revue Nature, révèlent la découverte d'une nouvelle classe d'antibiotique dont la platensimycine, active contre ce Staphylocoque (WANG et SOISSON, 2006). Cet antibiotique est produit à partir d'une nouvelle souche de *Streptomyces platensis* isolée du sol de l'Afrique du sud.

Le chloroforme est un solvant de polarité intermédiaire. L'acétate d'éthyle est un solvant de polarité moyenne. Par contre le méthanol est un solvant polaire.

Ces données chimiques nous permettent de conclure que les molécules sont de polarité intermédiaire et d'autres sont polaires.

On constate que certains extraits sont actifs contre les microorganismes tests et d'autres non. Les différences entre les diamètres d'inhibition observées ne sont pas significatives (test de l'ANOVA). Néanmoins, on peut constater d'après les résultats du tableau XX que l'extrait

chloroformique de la souche S3 a inhibé un plus grand nombre de souches tests (4 souches) comparées au restant des extraits.

Il faut noter que l'activité antibactérienne a été trouvée dans les extraits bruts des souches d'actinomycètes, obtenus à partir des cultures liquides. 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, 1973 ; SHOMURA *et al.*, 1979 ; RADHIKA *et al.*, 2011 ; SHARMA *et al.*, 2011). C'est le cas pour la souche S1 qui n'a montré qu'une seule activité.

L'activité antimicrobienne d'un extrait est probablement due à la présence de synergie entre le nombre de composants qui lorsqu'ils sont séparés deviendraient inactifs individuellement (RIOS et RECIO, 2005).

Par ailleurs, l'absence d'effet bactériostatique ou bactéricide sur ces souches testées pourrait être due soit à la résistance de celles-ci ou bien à l'insuffisance de la concentration utilisée.

En effet, HAYOUNI *et al.* (2007) ont montré que la méthode d'extraction et la nature du solvant peuvent influencer l'activité antimicrobienne. Le diamètre de la zone d'inhibition diffère d'une bactérie à une autre et d'un extrait à un autre. La variation de l'activité antimicrobienne des extraits explique les variations de leurs compositions chimiques.

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 (ZOUAGHI, 2007).

Il a été démontré que l'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de production de métabolites secondaires. En effet, il a été rapporté par MELLOULI *et al.* (2004), que *Streptomyces* TN58, la meilleure production de molécules bioactives est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm. Pour des agitations supérieures ou inférieures à cet intervalle, la production de molécules bioactives chute fortement.

Selon REGHIOUA *et al.* (2008), à cause de l'agitation en milieu liquide, les filaments mycéliens se fragmentent, et les petits fragments se trouvent incapables de produire des

quantités importantes d'antibiotiques, contrairement au milieu solide où la fragmentation de mycéliums peut être évitée ce qui favorise la production importante d'antibiotique (GURUNG *et al.*, 2009).

4. Effet du pH et de la température sur la production d'antimicrobien par les souches actinomycétales S2 et S3

Pour cette partie de ce travail, seuls les extraits organiques de la souche S2 et S3 ont été testés, vu que ceux de la souche S1 n'ont pratiquement pas montré d'activité intéressante.

Les tableaux ci-dessous illustrent l'effet du pH et de la température sur les extraits qui ont montré une activité antimicrobienne vis-à-vis des souches tests lors du test précédent.

Tableau XXII : Effet du pH et de la température sur l'activité antimicrobienne des extraits organiques de la souche actinomycétale (S2) déterminée par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Extraits organiques	pH et T°	Souches tests		
		<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>E.coli</i>	<i>P.aeruginosa</i>
Méthanol	pH= 3	/	/	*6±00
	pH= 7	/	/	6±00
	pH= 11	/	/	6±00
	T = 4° C	/	/	6±00
Chloroforme	pH= 3	11±2,12	/	/
	pH= 7	6±00	/	/
	pH= 11	6±00	/	/
	T = 4° C	6±00	/	/
Acétate d'éthyle	pH= 3	/	6±00	12,75±1,77
	pH= 7	/	6±00	6±00
	pH= 11	/	11,5±00	6±00
	T = 4° C	/	15±2,12	6±00

/ : Test non réalisé ; * : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des disques en papier).

Tableau XXIII : Effet du pH et de la température sur l'activité antimicrobienne des extraits organiques de la souche actinomycétale (S3) déterminée par la méthode des disques en papier (diamètre des zones d'inhibition en mm) (n=2).

Extraits organiques	pH et T°	Souches tests				
		<i>E.coli</i> ATCC 25922	<i>S.aureus</i>	<i>P.aeruginosa</i>	<i>K.pneumoniae</i>	<i>A. niger</i>
Méthanol	pH= 3	/	/	/	*6±00	16±2,12
	pH= 7	/	/	/	6±00	10±00
	pH= 11	/	/	/	6±00	16,75±8,83
	T = 4° C	/	/	/	6±00	17±7,78
Chloroforme	pH= 3	6±00	6±00	6±00	6±00	/
	pH= 7	6±00	6±00	6±00	6±00	/
	pH= 11	15,75±6,01	6±00	6±00	6±00	/
	T = 4° C	6±00	7,25±1,7	6±00	6±00	/
Acétate d'éthyle	pH= 3	/	/	/	/	/
	pH= 7	6,25±0,35	/	/	/	/
	pH= 11	10,75±0,35	/	/	/	/
	T = 4° C	13±4,24	/	/	/	/

/ : Test non réalisé ; * : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des disques en papier).

Les figures (55 et 56) illustrent les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus avec les différents extraits organiques (acétate d'éthyle, chloroforme, méthanol) après variation du pH, et conservation des extraits à 4°C pendant quatre jours des deux souches actinomycétales (S2 et S3) respectivement, pour les différentes souches microbiennes qui ont montré précédemment une sensibilité.

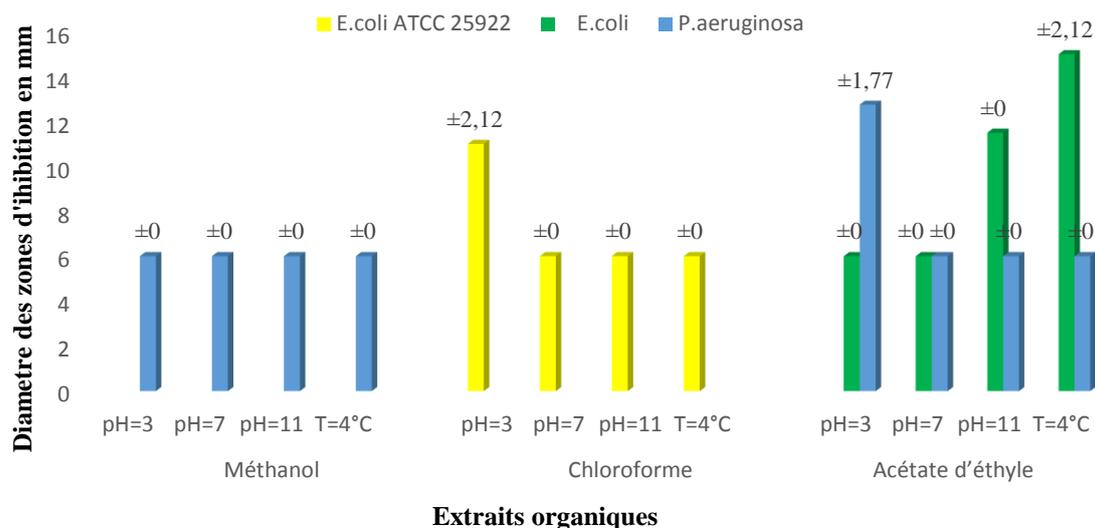


Figure 55 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) vis-à-vis des microorganismes-tests en fonction du pH et de la température (4°C), exprimées par les différents extraits organiques de la souche S2.

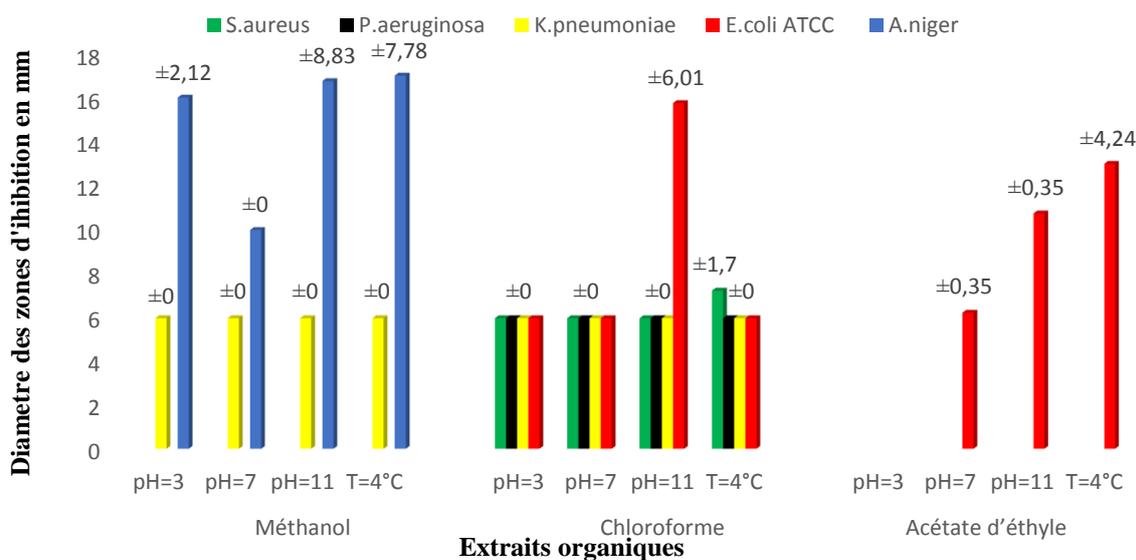


Figure 56 : Représentation graphique des diamètres des zones d'inhibition (en mm) vis-à-vis des microorganismes-tests en fonction du pH et de la température (4°C), exprimées par les différents extraits organiques de la souche S3.

Les différents résultats obtenus sont illustrés dans les figures ci-contre, montrant la sensibilité et la résistance des différents microorganismes tests vis-à-vis des trois extraits organiques des deux souches actinomycétales (S2 et S3), après variation du pH et effet de la température à 4°C sur l'activité antimicrobienne.

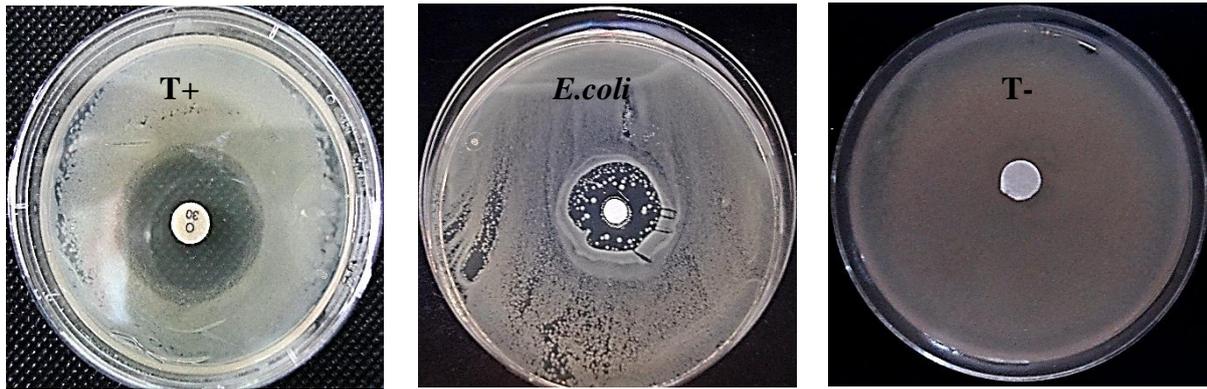


Figure 57 : Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur *Escherichia coli* soumis à 4°C pendant 4 jours (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle).



Figure 58 : Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur *Pseudomonas aeruginosa* dont le pH est ajusté à 3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle).



Figure 59 : Absence d'Effet de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche S2 sur *Pseudomonas aeruginosa* dont le pH est ajusté à 11 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec l'acétate d'éthyle).



Figure 60 : Effet de l'extrait méthanolique de la souche S3 sur *Aspergillus niger* dont le pH est ajusté à 11 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le méthanol).



Figure 61 : Effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur *Escherichia coli* ATCC dont le pH est ajusté à 11 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le chloroforme).



Figure 62 : Absence d'effet de l'extrait chloroformique de la souche S3 sur *Escherichia coli* ATCC dont le pH est ajusté à 3 (T+ : Témoin positif ; T- : Témoins négatifs réalisés avec le chloroforme).

Pour la souche S2, après avoir ajusté le pH des différents extraits organiques (3,7 et 11) et après une conservation à 4°C pendant 4 jours, l'extrait méthanolique a perdu complètement son activité vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa*. Le chloroforme ajusté à un pH de 3 conserve son activité contre *Escherichia coli* ATCC 25922 avec un diamètre d'inhibition compris entre 9 et 15 mm. En ce qui concerne l'acétate d'éthyle, l'inhibition vis-à-vis d'*Escherichia coli* est maintenue avec un pH alcalin (11) avec un diamètre compris entre 11 et 12 mm. Pour le même germe, l'inhibition est aussi observée avec l'extrait soumis à 4°C.

Les résultats de ce test indiquent que l'extrait méthanolique de la souche S3 ajusté à différents pH (3, 7 et 11) et à 4°C exprime une forte activité à l'égard d'*Aspergillus niger* allant de 10 à 23 mm (figure 60). On a constaté aussi que l'acétate d'éthyle conserve son effet inhibiteur face à *Escherichia coli* ATCC 25922 à un pH alcalin et neutre (7 et 11) avec un diamètre d'inhibition variant entre 7 et 12 mm, de même pour la fraction soumise 4°C (10 ≤ Ø ≤ 20 mm). Seul l'extrait chloroformique conservé à 4°C pendant 4 jours montre une légère inhibition contre *Staphylococcus aureus* avec un diamètre compris entre 8 et 9 mm.

Aucune zone d'inhibition de croissance de *Klebsiella pneumoniae* et de *Pseudomonas aeruginosa* a été observée ni sur la gamme du pH testée, ni sur la température.

La production d'antibiotiques varie quantitativement et qualitativement suite à une modification des conditions de culture de l'organisme producteur (TANAKA, 1992 ; HIGGS *et al.*, 2001) comme le pH et la température.

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition des extraits bruts traités (ajustés à différentes valeurs du pH) avec ceux non traités nous permettent de conclure que le pH a un effet significatif sur la stabilité des molécules antimicrobiennes et donc sur la persistance de leur activité passant d'une souche-test à l'autre et d'un extrait organique à l'autre. Le diamètre des zones d'inhibition engendrées par l'extrait méthanolique de la souche S3 envers *Aspergillus niger* a doublé. Des travaux réalisés par LOUCIF (2011), ont montré que le pH a un effet sur les extraits organiques, en obtenant des diamètres des zones d'inhibition plus importants avec les extraits traités (le double du diamètre des zones d'inhibition engendrées par les extraits non traités) envers *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

L'inexistence de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques et méthanoliques envers *Klebsiella pneumoniae* et *Pseudomonas aeruginosa* ne signifie pas

qu'elle est absente totalement, elle peut être présente à des pH supérieurs à 11. Des travaux ultérieurs réalisés par MUIRU *et al.* (2007) montrant la présence de l'activité antifongique envers *Pythium sp.* à des pH allant de 12 à 14.

D'après FLORY *et al.* (1949), un composé qui est soluble dans un solvant organique à pH acide est lui-même acide. En se basant sur ces données, on peut conclure que les extraits bruts chloroformiques de la souche S3 comportent probablement des molécules antibactériennes de nature basique actives envers *Escherichia coli* ATCC 25922, tandis que les extraits à l'acétate d'éthyle renferment des molécules de nature chimique neutre et basique à la fois actives contre *Escherichia coli* ATCC 25922. Les extraits bruts méthanoliques de la souche S3 ayant montré une activité contre *Aspergillus niger* avec les différents pH utilisés, comporte probablement des molécules de nature chimique acide, neutre et basique.

CONCLUSION

ET

PERSPECTIVES

Ce présent travail constitué de trois parties entre dans le cadre de l'axe de recherche de métabolites secondaires à activité antimicrobienne produite par trois souches actinomycétales

La première partie a porté sur la caractérisation partielle des trois actinomycètes S1, S2 et S3. Pour cela nous avons réalisé plusieurs analyses qui sont :

- Des tests morphologiques utilisant les milieux de culture solides. Les résultats obtenus laissent fortement supposer que les trois souches étudiées sont des actinomycètes du genre *Streptomyces*.
- Des études physiologiques et biochimiques qui s'intéressent à la capacité des isolats à dégrader les glucides, à réduire les nitrates, à produire des pigments mélanoïdes et à produire des enzymes. Ces résultats ont permis de connaître certains caractères de cultures pouvant être utilisés pour l'identification.

Dans la seconde partie, on s'est intéressé à la recherche des molécules antimicrobiennes potentiellement produites par des souches isolées lors de travaux antérieurs.

Dans la troisième partie de ce travail, nous avons effectué des cultures en erlenmeyers afin de produire les molécules antimicrobiennes en question, d'essayer de les extraire à l'aide de solvants organiques et de les caractériser partiellement.

Le test d'activité des extraits organiques indique que le méthanol, le chloroforme et l'acétate d'éthyle seraient de bon extracteur de ces activités pour les souches S2 et S3, car ils permettent d'exprimer de bons spectres d'action à l'égard des germes cibles testés.

On peut conclure que les antimicrobiens produits par les souches actinomycétales S2 et S3 peuvent être polaire et d'autres de polarité intermédiaire. Les extraits actifs de ces souches renferment des molécules bioactives qui peuvent être acide, neutre, et basique. Malheureusement, avec ces données il nous est impossible d'émettre la moindre hypothèse quant à la structure et à la nature possible de ces molécules.

L'ensemble des résultats obtenus pour les trois souches donne un aperçu général sur le potentiel de ces souches à produire des molécules antimicrobiennes.

Enfin, nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi, car plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- Préciser l'identification des souches isolées par des tests chimiotaxonomiques et des analyses phylogénétiques basées sur d'autres marqueurs moléculaires.
- Une piste très intéressante à suivre serait l'optimisation des paramètres culturels afin d'améliorer la production d'antibiotiques
- Détermination du spectre d'action des substances produites sur d'autres bactéries et en particulier sur des bactéries multirésistantes.
- Identifier et caractériser le principe actif des souches d'actinomycètes représentatives.
- Utiliser d'autres solvants d'extraction de différentes polarités pour choisir l'extrait à plus grand spectre d'activité
- Mélanger les extraits des trois souches afin d'étudier l'effet de combinaison contre les germes tests.
- Essai *in vivo* de l'effet des biomolécules secrétées.

RÉFÉRENCES
BIBLIOGRAPHIQUES

- **ABBAS I. H. (2006).** A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait. *J. Appl. Sci. Res.*, 10 : 809-815.
- **ABOUL-ENEIN A., ABOUT ELALLA F., SEROUR E., HUSSIEN T. (2010).** Antimicrobial compound produced by *Nocardia sp.* *Int. J. of Acad Res.*, 2 : 81-85.
- **ADACHI T., MORIMOTO S. (2002).** Clarithromycin and new derivatives of erythromycin. *Birkh. Verlag.*, 6 : 53-72.
- **ALEKSHUN M. N., LEVY S.B. (2007).** Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell.*, 128 : 1037-1050.
- **AOYAGI T., YAGISAWA M., KUMEGAI M., HAMADA M., OKAMI Y., TAKEUCHI T. (2006).** An enzyme inhibitor, Panostalin produced by *Streptomyces*. *J. of Anti.*, 24 : 860-869.
- **ASANZA-TERNUEL M. L., GONTIER E., BIENAIME C., NAVA-SAUCEDO J. E., BARBOTIN J. N. (1977).** Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enz. and Mic. Tech.*, 21 : 314-320.
- **BADJI B. (2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri. Tizi ouzou.
- **BADJI. B., ZITOUNI. A., MATHIEU. F., LEBRIHI. A., SABAOU S. (2006).** Antimicrobial compound produced by *Actinomadura sp.* AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, 52 : 373-382.
- **BAKER K. F., COOK J. R. (1 974).** Biological control of plant pathogens. *W. H. Free. and Comp.*, 35 : 310-350.
- **BALAGURUNATHA R., RADHAKRISHNON M., SOMASUMDAROMS T. (2010).** L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Aus. J. of Bas. and App. Sci.*, 4 : 698-705.
- **BALDACCI E. (1962).** Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann. Soc. Belge. Méd. Trop.*, 4 : 633-646.
- **BALTZ R. H. (2008).** Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. *Curr. Opin. Pharmacol*, 8 : 1-7.
- **BANIASADI F., SHAHIDI G. H., KARIMI NIK A. (2009).** In vitro petroleum decomposition by actinomycetes isolated from petroleum contaminated soils american- Eurasian. *J. of Agr. and Env. Sci.*, 6 : 268-270.

- **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. J.*, 2 : 453-466.
- **BECKER B., LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. A. (1965).** Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13 : 236-242.
- **BEHAL V. (2003).** Alternative sources of biologically active substances. *F. Microbiol.*, 48 : 563-571.
- **BELYAGOUBI L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en substances naturelles, activités biologiques et synthèse. Université Aboubakr Belkaïd. Tlemcen.
- **BENYAOU A. (2015).** Isolement des souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives. Mémoire de Master en microbiologie appliquée. Université Mouldoud Mammeri. Tizi ouzou.
- **BERDY J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58 : 1-26.
- **BERDY J. (2012).** Thoughts and facts about antibiotics: Where we are now and where we are heading. *J. Antibiot.*, 65 : 385–395.
- **BERGEY'S MANUAL OF SYSTEMATIC BACTERIOLOGY, VOLUME 5 (2012).** WHITMAN W. B., GOODFELLOW M., KÄMPFER P., BUSSE H. J., TRUJILLO M. E., LUDWIG W., SUZUKI K. I. *Spring., 2nd Edition.*
- **BIEHAL V. (2000).** Bioactive products from *Streptomyces*. *Adv. Appl. Microbiol.*, 47 : 165-216.
- **BLOOMFIELD S. F. (2002).** Significance of biocide usage and antimicrobial resistance in domiciliary environments. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement.*, 92 : 144-157.
- **BOERLIN P., WHITE D. G. (2006).** Antimicrobial resistance and its epidemiology. *Bla. Publish.*, 13 : 27-43.
- **BOGDANOVICH T., EDNIE L. M., SHAPIRO S., APPELBAUM P. C. (2005).** Antistaphylococcal activity of ceftobiprole, a new broad-spectrum cephalosporin. *Ant. A. Chemother*, 49 : 4210-9.
- **BOIRON P., PROVOST F., DUPONT B. (1993).** Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. *Inst. Pas.*, 42 : 180-190.

- **BOUCHEFA K. (2011).** Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits. Magister en microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira. Bejaia.
- **BOUDEMAGH A. (2007).** Isolement, à partir des sols sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université Mentouri. Constantine.
- **BOUDJELLA H., BOUTI K., ZITOUNI A., MATHIEU F., LEBRIHI A., SABAOU N. (2007).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium sp.* 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, 161 : 288-298.
- **BOUSSABER E., MEFTAH KADMIRI I., HILALI A., HILALI I. (2012).** Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques. *Sci.*, 12 : 30-34.
- **BRAÑA A. F., WOLF S., DEMAIN A. L. (1985).** Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. of Microbiol.*, 31 : 736-743.
- **BURGESS R. R., TRAVERS A. A., DUNN J. J., BAUTZ E. K. (1969).** Factor stimulating transcription by RNA polymerase. *Nat.*, 221 : 43-46.
- **BUSSCHER G. F., RUTJES F. P., VAN DELFT F. L. (2005).** 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics, *Chem. Rev.*, 105 : 775-791.
- **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. *J. Mycol. Méd.*, 6 : 129-132.
- **CARELOTTI A., BOIRON P., PROVOST P., VILLARD J. (1994).** *Nocardia* et bactéries apparentées. *Man. Bact.*, 2 : 811-831.
- **CARLE S., BOIRON P., PHARM B. (2003).** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharm.*, 36 : 25-41.
- **CARLE S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important *Pharmactuel*, 422 : 6-21.
- **CASSANI G., BURGESS R. R., GOODMAN H. M. et GOLD L. (1971).** Inhibition of RNA polymerase by streptolydigin. *Nat. New. Biol.* 230 : 197-200.
- **CELMER W. D., TANNER F. W., HARFENIST M., LEES T. M., SOLOMONS I. A. (1952).** Characterization of antibiotic thiolutin and its relationship with aureothricin. *Chem. Soc.*, 74 : 6304-6305.

- **CHIBA H., AGEMATU H., KANETO R., TERASAWA T., SAKAN K., DOBACHI K., YOSHIOKA T. (1999).** Rhodopeptins (Mer-N1033), novel cyclic tetrapeptides with antifungal activity from *Rhodococcus* sp. *J. Antibiot.*, 52 : 695-699.
- **CHIBA H., INOKOSHI J., OKAMOTO M., ASANUMA S., MATSUZAKI K., IWAMA M., MIZUMOTO K., TANAKA H., OHEDA M., FUJITA K., NAKASHIMA H., SHINOSE M., TAKAHASHI Y., OMURA S. (2001).** Actinohivin, a Novel Anti-HIV Protein from an Actinomycete That Inhibits Syncytium Formation: Isolation, Characterization, and Biological Activities. *Biochem. and Bioph.*, 282 : 595-601.
- **CHRISTENSEN B. G., LEANZA W. J., BEATTIE T. R., PATCHETT A. A., ARISON B. H., ORMOND R. E., KUEHL F. A., ALBERTS-SCHONBERG J. R. G., JARDETZKY O. (1969).** Phosphonomycin: structure and synthesis. *Sci.*, 166 : 123-124.
- **CICILIATO I., CORTI E., SARUBBI E., STEFANELLI S., GASTALDO L., MONTANINI N., KURZ M., LOSI D., MARINELLI F., SELVA E. (2004).** Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. *Antibiot.*, 57 : 210-217.
- **COLLINS M. D., GOODFELLOW M., MINNIKIN D. E. (1980).** - Fatty acid, isoprenoid quinone and polar lipid composition in the classification of *Curtobacterium* and related taxa. *Microbiol.*, 118 : 29-37.
- **COOK A. E., MEYERS P. R. (2003).** Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S-rRNA gene restriction fragment patterns. *Microbiol.*, 53 : 1907-1915.
- **CORONELLI C., WHITE R.J., LANCINI G. C., PARENTI F. (1975).** Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes.II. Isolation, chemical, biological and biochemical characterization. *Antibiot.*, 28 : 253-259.
- **CORTES J., LIRAS P., CASTRO J. M., MARTIN J. M. (1986).** Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* exerted on the formation of alpha-aminoadipylcysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J. of Gen. Microbiol.*, 132 : 1805-1814.
- **COTARLET M., BAHRIM G. E., NEGOITA T. G., STOUGAARD P. (2010).** Characterization of Newly Polar Psychrotrophic Streptomyces Isolated from Polar Soils with Cold Adapted Bioremediation Potential. *Olu. Napo.*, 38 : 61-65.
- **COX E. C., WHITE J. R., FLAKS J. G. (1964).** Streptomycin action and the ribosome. *Acad. Sci.*, 51 : 703-709.
- **CRUM G. F., DEVRIES W. H., EBLE T. E., LARGE C. M., SHELL J. W. (1955-1956).** Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. *Antibiot.*, 3 : 893-896.

- **DAVIES J. E. (1964).** Studies on the ribosomes of streptomycin-sensitive and resistant strain of *Escherichia coli*. *Acad. Sci.*, 51 : 659-664.
- **DEBOER C., DIETZ A., SAVAGE G. M., SILVER W. S. (1955-1956).** Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. *Antibiot.*, 3 : 886-892.
- **DEBOER E. C., DE DEJKHUIJZEN T. M., VOS P. C. N., KURTH K. H., SCHAMHART D. H. J. (2000).** Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell-wallskeletons (Rubratin) and *Bacillus Calmette-Guerin* as therapy superficial bladder cancer: A comparative study., *Clin. Infec. Dis.*, 31 : 65-76.
- **DECKER S. R., ADNEY W. S., TOOD B. (2001).** Two novel alkalotolerant dextranases from *Streptomyces anulatus*. *J. of Ame. Chem. Soci. Sympo.*, 769 : 222-235.
- **DEKLEVA M. L., TITUS J. A., STROHL W. R. (1985).** Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceticus* in a defined medium. *Can. J. of Microbiol.*, 31 : 287-294.
- **DELARRAS C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. *Méd. Int. Lav.*, 23 : 450-476.
- **DEMAIN A. L., SOLOMON N. A. (1986).** Manual of industrial microbiology and biotechnology. *Am. Soc. for Microb. Press.*, 8 : 359-364.
- **DEMAIN A. L. (1989).** Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. *C. R. C. Press.*, 52 : 127-134.
- **DESJARDIN V. (2002).** Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Thèse de Doctorat en sciences techniques du déchet. Université de Nancy.
- **DHUNGEL B., SUBEDI M., TIWARI K. B., SHRESTHA U. T., POKHREL S., AGRAWAL V. P. (2007).** Thermostable glucose isomerase from psychrotolerant *Streptomyces sp.* *Int. J. of Li.*, 1 : 6-10.
- **DJABALLAH C. (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérantes isolés de la Sebkhia Ain M'lila. Magistère en microbiologie appliquée. Université Mentouri, Constantine.
- **DLAUNAY S. RONDAGS E., GERMAIN P. (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. *Mass.*, 1 : 1-12.
- **DOMMERGUES Y., MANGENOT F. (1970).** Ecologie microbienne du sol. *Mass. et Cie.*, 36 : 5-18

- **DUGGAR B. M. (1948).** Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics. *Acad Sci.*, 51 : 177-181.
- **DULANEY E. L. (1948).** Observations on *Streptomyces griseus* nitrogen sources for growth and streptomycin production. *J. of Bact.*, 56 : 305-313.
- **DUMENIL D., SANGLIER J. J. (1989).** Physiologie de la production des antibiotiques. *Mass.*, 56 : 195-217.
- **DUVAL J., SOUSSY C. J. (1990).** Antibiothérapie. *Mass.*, 7 : 15-56.
- **ELLAIAH P., RAJU K. V., ADINARAYANA K., ADINARAYANA G., PRABHAKAR T., PREMKUMAR J. (2002).** Bioactive rare actinomycetes from indigenous natural substrates of Adhra Pradesh. *Hind. Antibiol. Bult.*, 44 : 17-24.
- **ELWAN S. H., DAB A., AL-GOUNAIM Y. (1985).** Ecology of the Streptomycetes flora in the desert soil of Kuwait. *Syst. Appl. Microbiol.*, 6 : 99-104.
- **EUNICE J. A., PROSSER J. I. (1983).** Mycelial growth and braching of *Streptomyces coelicolor*. *Microbiol.*, 129 : 2029-2036.
- **ERRAKHI R. (2008).** Contribution d'actinomycètes (Actinobactéries) à la lutte biologique contre *Sclerotium rolfsii* et rôle de l'acide oxalique dans l'induction des mécanismes de défense. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université Cadi Ayyad. Marrakech.
- **ESCALANTE L., GONZALEZ R., OBREGON A. M., SANCHEZ S. (1992).** Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *J. of Antibio.*, 45 : 465-469.
- **FALAGAS M. E., KASTORIS A. C., KARAGEORGOPOULOS D. E., RAFAILIDIS P. I. (2009).** Fosfomycin for the treatment of infections caused by multidrug-resistant non-fermenting Gram-negative bacilli. *Int. J. of Anti. Age.*, 34 : 111-20.
- **FENG C., LING H., DU D., ZHANG J., TAN H. (2014).** Novel nikkomycin analogues generated by mutasynthesis in *Streptomyces ansochromogenes*. *Microb. Cell. Fact.*, 13 : 1-10.
- **FENICAL W., JENSEN P. R. (2006).** Developping a new resource for drug discovery marine actinomycete bacteria. *Nat. Chem. Bio.*, 2 : 666-673.
- **FINLAY A. C., HOBBY G. L., P'AN S. Y., REGNA P. P., ROUTIEN J. B., SEELEY D. B., SHULL G. M., SOBIN B. A., SOLOMONS I. A., VINSON J. W., KANE J. H. (1950).** Terramycin, a new antibiotic. *Sci.*, 23 : 111- 85.
- **FLORY H. W., CHAIN E., HEATLY N. G., JENNINGS M. A., SANDERS A. G., ABRAHAM E. P., FLOREY M. E. (1949).** Antibiotics: survey of penicillin, streptomycin, and other antimicrobial substances from fungi, actinomycetes, bacteria, and plants. *Oxf. Uni. Press.*, 26 : 387-392.

- **FUKUNAGA K., MISATOT T., ASAKAWA M. (2009).** A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. *Bul of Agri. Chemi. Soci of Jap.*, 19 : 181-188.
- **GASPERINI G. (1892).** *Microbiologie. Igi. Sper.*, 22 : 339-428
- **GATHOGO E. W., WAUGH A. C., PERIC-CONCHA N., REDPATH M. B., LONG P. F. (2004).** Rapid detection of rare actinomycetes in environmental samples. *Biotechnol. Lett.*, 26 : 897-900.
- **GAUDY C., BUXERAUD J. (2005).** Antibiotiques, pharmacologie et thérapeutique. *Colle. Pharm. Elsev.*, 18 : 12-26.
- **GEORGE S. P., AHMAD A., RAO M. B. (2001).** Studies of carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Biores. Tech.*, 77 : 171-175.
- **GERALDINE M., SCHOFIELD M., SCHAAL K. P. (1981).** A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *Microbiol.*, 127 : 237-259.
- **GERSCH D., ROEMER W., BOCKER H., THRUM H. (1978).** Variations in cyclic adenosine 3',5'- monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *Micr. Lett.*, 3 : 39-41.
- **GOODFELLOW M., WILLIAMS S. T. (1983).** Ecology of the actinomycetes. *Microbiol.*, 37 : 189-216.
- **GOODFELLOW M., O'DONNELL A. G. (1989).** Search and discovery of industrially-significant actinomycetes. *Cam. Uni. Press.*, 22 : 343-383.
- **GORDON R. E., SMITH M. M. (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *Bact.*, 66 : 41-48.
- **GORDON R. E., BARNETT D. A., HANDERHAN J. E., PANG C. H. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the Nocardin Strain. *Syst. Bacteriol.*, 24 : 54-63.
- **GOTTLIEB D. (1973).** General consideration and implication of the Actinomycetales. *Acad. Press.*, 63 : 69-75.
- **GRANDHIMATHI R., ARUNKUMAR M., SELVIN J., THANGAVELU T., SIVARAMAKRISHNEN S., KIRAN G. S. (2007).** Potentiel antimicrobien d'actinomycètes marins associés aux éponges. *J. of Med. Myco.*, 18 : 16-22.
- **GUARDABASSI L., COURVALIN P. (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. *A. S. M. Press.*, 2 : 1-18.
- **GUIRAUD J. P. (1998).** Microbiologie alimentaire. *Dunod.*, 49 : 79-168.

Références bibliographiques

- **GUPTA R. C., TANDON R. N. (1977).** Growth inhibition of fungi by volatiles from streptomycetes. *Trans. Br. Mycol.*, 68 : 438-439.
- **HACENE H., SABAOU N., BOUNAGA N., LEFEVRE G. (1994).** Screening for nonpolyenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. *Microbios.*, 79 : 5-81.
- **HASLAY C., LECLERC H. (1993).** Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier *TEC & DOC.*, 11 : 137-149.
- **HAYAKAWA M., YOSHIDA Y., IIMURA Y. (2004).** Selective isolation of bioactive soil actinomycetes belonging to the *Streptomyces Violaceusniger* phenotypic cluster. *Appl. Microbiol.*, 96 : 973-981.
- **HAYOUNI E A., ABEDRABBA M., BOUIX M., HAMDI M. (2007).** The effect of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* and *Juniperus phoenicea*. *Chem.*, 105 : 1126-1134.
- **HAZEN E. L., BROWN R. (1951).** Fungicidin, an antibiotic produced by soil actinomycete. *Bio. Med.*, 76 : 93-97.
- **HENDLIN D., STAPLEY E. O., JACKSON M., WALLICK H., MILLER A. K., WOLF F. J., MILLER T. W., CHAIET L., KAHAN F. M., FOLTZ E. L., WOODRUFF H. B., MATA J. M., HERNANDEZ S., MOCHALES S. (1969).** Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomycetes. *Sci.*, 166 : 122-123.
- **HERNANDEZ A., LOPEZ J. G., ARENAS M., SANTAMARIA R., DIAZ M., FERNANDEZ J. M. (2008).** Xylan-binding xylanase Xyl 230 from *Streptomyces avermitilis* cloning characterization and overproduction in solid state fermentation. *Int. Microb.*, 11 : 133-141.
- **HIGGS R. E., ZAHN G. A., GYGI J. D., HILTON M. D. (2001).** Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *App. and Env. Micro.*, 67 : 371-376.
- **HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T., WILLIAMS S. T. (2000).** Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. *Will. & Kilk.*, 15 : 619-623.
- **HOPWOOD D. A., LYDIATE D. J., MALPARTIDA F., WRIGHT H. M. (1985).** Conjugative sex plasmids of *Streptomyces*. *Toppan Co.*, 30 : 615-634.
- **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 Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Appl. and Env. Micro.*, 67 : 3739-3745.
- **IKINOSE Y., GENKA K., KOIKE T., KATO H., WTANAKE Y., MORI T. (2003).** Randomized double-blind placebo stage I squamous-cell lung carcinoma. *J. of Nat. Can. Inst.*, 95 : 605-610.

- **INOUE O. O., NETTO W., S., PADILLA G., FACCIOTTI M.C.R. (2007).** Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Bra. J. of Microbiol.*, 38 : 58-61.
- **ISHIZAWA S., ARARAGI M. (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. Toppan Co.*, 85 : 97-107.
- **ISLAM M. R., JEONG, Y. T., RYU Y. J., SONG C. H., LEE Y. S. (2009).** Isolation, Identification and Optimal Culture Conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 Producing Antifungal Agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Myco.*, 37 : 20-114.
- **IWAI Y., OMURA S. (1973).** Selective fermentation of cerulenin by *Cephalosporin caeruleus*. *Technol.*, 51 : 575-578.
- **IWAI Y., TAKAHASHI Y. (1992).** Selection of microbial sources of bioactive compounds. *Spring. Verlag.*, 25 : 281-302.
- **IWAMI M., NAKAYAMA O., TERANO H., KOHSAKA M., AOKI H., IMANAKA H. (2006).** A new immunomodulator, FR-900494: Physico-chemical and biological characteristics. *J. of Anti.*, 40 : 612-622.
- **JACQUE A. (1985).** Recherche de nouvelles substances produites par les actinomycetales. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Nancy.
- **JARADAT Z., DWAGREH A., ABABNEH Q., SAADOUN I. (2008).** Influence of culture condition on cellulose production by *Streptomyces sp* (Strain J2). *Bio. Sci.*, 1 : 141-164.
- **JENSEN H. L. (1931).** Bacteriology. *Soc. N. S. Wales.*, 56 : 334-370.
- **JENSEN H. L. (1932).** Molecules. *Sci.*, 57 : 364-376.
- **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. Thèse de Doctorat en biotechnologies microbiennes. Université Sidi Mohamed Ben Abdellah. Fès.
- **JIMENEZ A., TIPPER D. J., DAVIES J. (1973).** Mode of action of thiolutin, an inhibitor of macromolecular synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Ant. A. Chem.*, 3 : 729-738.
- **JINENEZ J. T., STURDIKOVA M., STURDIK E. (2009).** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta. chimi. Slovaca.*, 2 : 63-74.
- **JORDAN D. C. (1961).** Effect of vancomycin on the synthesis of the cell wall mucopeptide of *Staphylococcus aureus*. *Biochem. Biophys.*, 6 : 167-170.

- **KAHAN F. M., KAHAN J. S., CASSIDY P. J., KROPP H. (1974).** The mechanism of action of fosfomycin. *Acad. Sci.*, 235 : 364-85.
- **KHAMNA S., YOKOTA A., PEBERDY J. F., LUMYONG S. (2010).** Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *Eur. J. of Bio. Sci.*, 4 : 23-32.
- **KHAN M. R., SAHA M. L., ZUHA S. B. (2008).** Bacteria and actinomycetes growing on floppy and compact discs under ambient conditions. *Bang. J. of Antib.*, 37 : 7-14.
- **KANG J. H., KONDO F. (2004).** *Streptomyces sp* strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Lett. in App. Microb.*, 39 : 178-180.
- **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*. *Microbiol. Biotechnol.*, 37 : 35-41.
- **KANO H. K., MATSUO Y., ADASHI K. (2005).** Mechercharmycin A et B cytotoxic substance from marine derived *Thermoactinomyces sp.* YM3- 251. *J. of Antib.*, 58 : 289-92.
- **KAUFFMAN C. A., CARVER R. L. (1997).** Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developpements. *Dru.*, 53 : 539-549.
- **KEULEN G. V., JONKERS H. M., CLOSSON H. A. B. (2003).** Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol.*, 185 : 1455-1458.
- **KIM B., SAHIN N., MINNIKIN D. E., ZAKRZEWSKA-CZERWINSKA J., MORDARSKI M., GOODFELLOW M. (1999).** Classification of thermophilic streptomycetes, including the description of *Streptomyces thermoalkalitolerans*. *Bac.*, 49: 7-17.
- **KIM M. K., PARK H.S., KIM C. H., CHOI W. (2002).** Inhibitory effect of nikkomycin Z on chitin synthases in *Candida albicans*. *Yea.*, 19 : 341-349.
- **KIM D. W., CHATER K., LEE K. J., HESKETH D. (2005).** Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *Bac.*, 187 : 2957–2966.
- **KITOUNI M., BOUDEMAGH A., OULMI L., REGHIOUA S., BOUGHACHICHE F. et ZERIZER H. (2005).** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. of Med. Myco.*, 15 : 45-51.

- **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.
- **KOMATSU K., TSUDA M., TANAKAY., MIKAMI Y., KOBAYASHI J. (2005).** SAR studies of Brasilicar for immunosuppressive and cytotoxic activities. *Bioorg. Med Chem.*, 13 : 13-1507.
- **KORKMAZ H., UNALDI M. N., ASLAN B., CORAL G., ARICAN B., DINÇER S. (2003).** Keratinolytic activity of *Streptomyces* Strain BA7 a new isolate from Turkey. *Ann. of Microb.*, 53 : 85-93.
- **KOVÁCS K., ANTAL I., STAMPF G, KLEBOVICH I., LUDÁNYI K. (2010).** Composition Optimization and Stability Testing of a Parenteral Antifungal Solution based on a Ternary Solvent System. *Pharm. Sci. Tech.*, 11 : 15-19.
- **KRAINSKY A. (1914).** Mycologie. *Bakt. Parasitenk. Abt.*, 41 : 649-688.
- **KRASSILNIKOV N. A. (1938).** Microbiologia. *U.S.S.R.*, 7 : 335-355.
- **KROPENSTEDT R. M., STACKEBRANDT E., GOODFELLOW M. (1990).** Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 13 : 148-160.
- **KUMAR V., BHARTI A., GUPTA V. K., GUSAIN O., BISHT G. S. (2012).** Actinomycetes from solitary wasp mud nest and swallow bird mud nest. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 28 : 871-880.
- **KUSTER E., WILLIAMS S. T. (1964).** Selection of media for isolation of Streptomycetes. *Nat.*, 202 : 928-929.
- **KWON H. C., KAUFFMAN C. A., JENSEN P. R. (2006).** Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinospora*. *J. of Ame. Chem. Soci.*, 128 : 1622- 1632.
- **LABEDA D. P., TESTA R. T., LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. A. (1984).** *Saccharithrix* a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiosis*. *Bacteriol.*, 34 : 426-431.
- **LABEDA D. P. (1987).** Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus*. *Bacteriol.*, 37 : 19-22.
- **LABEDA D. P. (1992).** DNA-DNA hybridisation in the systematics of *Streptomyces*. *Gen.*, 115 : 249-253.
- **LABRO M. (2002).** Cellular accumulation of macrolide antibiotics. *Birkh. Verlag.*, 25 : 37-52.

- **LACEY J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol.*, 2 : 231-51.
- **LAKSHMIPATHY D. T., KRISHNAN K. (2009).** A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. *Int. J. of Integ. Bio.*, 6 : 132-136.
- **LARPENT J. P., SANGLIER J. J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. *Mass.*, 35 : 473-481.
- **LARPENT J. P., LARPENT-GOURGAUD M. (1990).** Mémento Technique de Microbiologie. *TEC. & DOC.*, 2 : 56-63.
- **LAZZARINI A., CAVALETTI L., TOPPO G., MARINELLI F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Ant. Van Leeu.*, 79 : 399-405.
- **LECHEVALIER H. A., LECHEVALIER M. P. (1967).** Biologie of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21 : 71-100.
- **LEBRIHI A., LEFEBVRE G., GERMAIN P. (1988).** Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *App Micr and Biotech.*, 28 : 44-51.
- **LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Syst. Bacteriol.*, 20 : 435-443.
- **LECHEVALIER M. P., BIEVRE C. D., LECHEVALIER H. A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipides composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5 : 249-260.
- **LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. A. (1980).** The chemotaxonomy of actinomycetes. *Arlin.*, 36 : 225-291.
- **LECHEVALIER M. P., PRAUSER H., LABEDA D. P., RUAN J. S. (1986).** Two new genera of nocardioform actinomycetes., *Syst. Bacteriol.*, 36 : 29-37.
- **LEE J. Y., HWANG B. K. (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Microbiol.*, 48 : 407-417.
- **LE MINOR G., VERON M. (1989)** Bactériologie médicale. *Méd. Sci. Flam.*, 3 : 869-903.
- **LEMRISS S., LAURENT F., COUBLE A., CASOLI E., LANCELIN J.M., SAINTPIERRE-BONACCIO D., RIFALI S., FASSOUANE A., BOIRON P., (2003).** Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Microbiol.*, 49 : 74-669.
- **LEVY S. B. (2002).** Factors impacting on the problem of antibiotic resistance. *Chem.*, 49 : 25-30.

- **LEWIS C., NIKITAS C. T., SCHWARTZ D. F., WILKINS J. R. (1955-1956).** Streptolydigin, a new antimicrobial antibiotic. *Antibiot. Annu.*, 3 : 897-902.
- **LI S., CHENA C., ZHANG H., GUO H., WANG H., WANG L., ZHANG X., HUAC S., YU J., XIAO P., LI R., TAN X. (2005).** Identification of natural compounds with antiviral activities against SARS-associated coronavirus. *Antiv. Res.*, 67 : 18-23.
- **LIESKE R. (1921).** Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, *Lip.*, 3 : 36-39.
- **LIU S., LIU S. Y., LU Z. X. (2007).** Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chi. J. of Biot.*, 23 : 1077-1081.
- **LOPES A., COELHO R.R., MEIRELLES M. N. I., BRANQUINHA M. H., VERMALHO A. B. (1999).** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*, partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Men. Inst.*, 94 : 763-770.
- **LOUCIF K. (2011).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université Mentouri. Constantine.
- **LOUNES A., LEBRIHI A., BENSLIMANE C., LEFEBVRE G., GERMAIN P. (1995).** Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, 31 : 304-311.
- **LOZNIEWSKI A., RABAUD C. (2010).** Résistance bactérienne aux antibiotiques. *C. C. L. I. N.*, 27 : 506-514.
- **MADIGAN M. T., MARTINKO J. M., PRKER J. (1997).** Biology of microorganisms. *Prent. Hal. Int.*, 22 : 86-95.
- **MADIGAN M., MARTINKO J. (2007).** Brock Biologie Des Microorganismes. *Nouv. Hor.*, 23 : 710-717.
- **MALET-GASON L., ROMERO F., ESPLIEGO-VAZQUEZ F., GRAVALOS D., FERNANDEZ-PUENTES J. L. (2009).** IB-00208, a new cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. *J. of Antib.*, 56 : 219-225.
- **MANE U. V., DESHMUKH A. M. (2009).** Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization. *Afr. J. of Biote.*, 23 : 6617-6620.
- **MARAZZI A., KURZ M., STEFANELLI S., COLOMBO L. (2005).** Antibiotics GE23077, novel inhibitors of bacterial RNA polymerase. *J. Antib.*, 58 : 260- 267.
- **MARCHAL N., BOURDON J. L. (1991).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Doi.* 63 : 489-509.

- **MARIAT F., SEBALD M. (1990).** Les actinomycètes. *Méd. Sci. Flamm.*, 12 : 45-63.
- **MARTIN J. F., DEMAIN A. L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Micr. Rev.*, 44 : 230-251.
- **MASKEY R. P., HELMKE E., KAYSER O., FEIBIG H. H., MAIER A., BUSHE A. (2004).** Anti-cancer and antibacterial trioscacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *J of Antib.*, 57 : 771-779.
- **MASON D. J., DIETZ A., DEBOER C., LINCOMYCIN. (1962).** A new antibiotic, discovery and biological properties. *Ant. A. Chem.*, 82 : 550-554.
- **MATAN N., MATAN N. (2008).** Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *Biodet & Biodeg.*, 62 : 75-78.
- **MCCLURE W. R. (1980).** On the mechanism of streptolydigin inhibition of *Escherichia coli* RNA polymerase. *Biol. Chem.*, 255 : 1610-1616.
- **MCCORMICK M. H., MCGUIRE J. M., PITTENGER G. E., PITTENGER R. C., STARK W. M. (1956).** Vancomycin, A New Antibiotic. *Ant. Ann.*, 3 : 606-611.
- **MC MANUS P. S., STOCKWEL V. O., SUNDIN G. W., JONES A. L. (2002).** Antibiotic use in plant agriculture. *Ann. Rev. Phytopatho.*, 40 : 443-465.
- **MEKLAT A., SABAOU N., ZITOUNI A., MATHIEU F., LEBRIHI A. (2011).** Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. *Env. Microbiol.*, 77 : 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. *Curr Mic.*, 49 : 400-403.
- **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. Res.*, 15 : 324-336.
- **MIGUELEZ E. M., HARDISSON C., MAUZANAL M. B. (2000).** Streptomycetes a new model to study cell death. *Microbiol.*, 3 : 153-158.
- **MINCER T. L., JENSEN P. R., KAUFFMAN C. A., W. FENICAL. (2002).** Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *App. Environ. Microbiol.*, 68 : 5005-5011.
- **MINNIKIN D. E., GOODFELLOW. M. (1981).** Lipids in the classification of actinomycetes. *Zent. Bakt.*, 11 : 99-109.

- **MISATO T. (1982).** Present status futur prospect of agricultural antibiotics. *Sci.*, 7 : 301-305.
- **MOREIRA K. A., ALBUQUERQUE B. F., TEIXEIRA M. F. S., PORTO A. L. F., LIMA J. L. (2002).** Application of protease from *Nocardiosis sp.* as a laundry detergent additive. *Microbiol. Biotechnol.*, 18 : 307-312.
- **MOREIRA M. R., PONCE A. G., DEL VALLE C. E., ROURA S. I. (2005).** Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. *Sci. and Tech.*, 38 : 565-570.
- **MORDARSKA H., MORDARSKI M., GOODFELLOW M. (1972).** Chemotaxonomic characters and classification of some nocardioform bacteria. *Gen. Microbiol.*, 71 : 77-86.
- **MOULY S., SELIER P. (2004).** Monitoring thérapeutique des anti-infectieux, des exigences réglementaires au bon usage du médicament. *Spring. Verlag.*, 12 : 92-98.
- **MOUTOU Y., BINGEN E., DEBOSCKER Y., DUBREUIL L. (2000).** Antibiotiques, Antiviraux, Anti-infectieux. *Lib. Eur.*, 65 : 89-101.
- **MUIRU W., MUTITU E. W., MUKUNYA D. M. (2007).** Characterization of antibiotic metabolites from actinomycetes isolates. *Sci.*, 8 : 7-28.
- **MUKAI A., FUKAI T., MATSUMOTO Y., ISHAKAWA J., HOSHINO Y., YAZAWA. (2006).** Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *J. of Antib.*, 59 : 9-366.
- **NANJWAD B., CHANDRASHEHARA S., GOUDANAVAR P. S., SHAMAREZ A. M., MANVI F. (2010).** Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Trop. J. of Pharm. Res.*, 9 : 373-377.
- **NAUCIEL C. et VILDE J. L. (2005).** Bactériologie Médicale Connaissances et Pratique. *Mass.*, 13 : 59-64.
- **NEMOTO A., HOSHINO Y., YASAWA K, ANDO A., MIKAMI Y., KOMKAKI H. (2002).** Asterobactin, a new siderophore group from *Nocardia asteroides*. *J. of Antib.*, 55 : 593-7.
- **NODWELL J. R., LOSICK R. (1998).** Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol.*, 180 : 1334–1337.
- **NOUREDINE. L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université Mouloud Mammeri. Tizi ouzou.

- **NYTHYA S., PANDIAN S. K. (2010).** Isolation of heterotrophic bacteria from Palk Bay sediments showing heavy metal tolerance and antibiotic production. *Microbiol. Res.*, 165 : 57-593.
- **OKAMI Y., HOTTA K. (1988).** Search and discovery of new antibiotics. *Acad. Press.*, 10 : 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*. *J. of Antib.*, 32 : 255-261.
- **OPPOLZER W., PRELOG V., SENSI P. (1964).** The composition of rifamycin B and related rifamycins. *Exper.*, 20 : 336-339.
- **ORSKOV J. (1923).** Investigations into the morphology of the ray-fungi. *Sci.*, 8 : 69-78.
- **OSADA H. (1998).** Bioprobes for investigating mammalian cell cycle control. *Antibiot.*, 51 : 973-981.
- **OSKAY M., TAMER A., AZERI C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Biotechnol.*, 3 : 441-446.
- **OSWALD E. T. et FERCHAU H. A. (1968).** Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plan. Soi.*, 28 : 187-192.
- **OTTOW J. C. G., GLATHE H. (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 16 : 170-171.
- **OUELHADJ A., AMEL A., SIZINE K., DJENANE D. (2014).** Evaluation de l'activité antibactérienne de l'huile essentielle d'*Eucalyptus camaldulensis* récolté en Algérie. *Rev. de Mic. Ind. Sant. Env.*, 2 : 145-162.
- **OULMI L. (2004).** Identification d'actinomycetales isolés des eaux et de sol de sebkha. Optimisation des milieu de culture de sporulation et de croissance. Mémoire de Magistere en biochimie et microbiologie appliquée. Université Mentouri. Constantine.
- **OVERBYE K. M., BARRETT J. F. (2005).** Antibiotics: where did we go wrong?. *Dru. Disc.*, 10 : 45-52.
- **PAMBOUKIAN C. R. D., GUIMARÃES L. M., FACCIOTTI M. C. R. (2002).** Applications of image analysis in the characterization of *Streptomyces olindensis* in submerged culture. *Microbiol.*, 33 : 17-21.
- **PARENTI F., PAGANI H., BERETTA G. (1975).** Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. *Antibiot.*, 28 : 247-252.

Références bibliographiques

- **PARK Y. S., MOMOSE I., TSUNODA K., OKABE M. (1994).** Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *App. Microbiol. and Biotech.*, 40 : 773-779.
- **PAYNE D. J., GWYNN M. N., HOLMES D. J., POMPLIANO D. L. (2007).** Drugs for bad bugs confronting the challenges of antibacterial discovery. *Nat. Rev. Drug. Discov.*, 6 : 29-40.
- **PELMONT J. (2005).** Les bactéries pour les technologies de l'environnement. *Sci.*, 2 : 28-40.
- **PERRY J. J., STANLEY J. T., LORY S. (2004).** Microbiologie. *Dun.*, 42 : 320-321.
- **PETTIT G. R., TAN R., MELODY N., KIELTY J. M., PETTIT R. K., HERALD D. L., TUCKER B. E., MALLAVIA L. P., DOUBEK D. L., SCHMIDT J. M. (1999).** Isolation and structure of montanastatin from a terrestrial actinomycete. *Bio. Med. Chem.*, 7 : 895-899.
- **PIEPERSBERG W., DISTLER J. (1997).** Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. *Biotech.*, 72 : 397-488.
- **PLOY M. C., LAMBERT T., GASSAMA A., DENIS F. (2000).** Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *An. Bio. Clin.*, 58 : 439-44.
- **POURRIAT J. L., MARTIN C. (2005).** Principe de réanimation chirurgicale. *Arne.*, 5 : 87-96.
- **PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (1993).** Micribiologie. *De Boe. & Lar.*, 65 : 649-656.
- **PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (2003).** Micribiologie. *De Boe. & Lar.*, 65 : 542-550.
- **PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (2007).** Microbiologie. *De Boe. & Lar.*, 65 : 326-334.
- **PRESCOTT T., HARLEY., KLEIN., WILEY J. M., SHERWOOD L. M., WOOLVERTON C. J. (2010).** Microbiologie. *De boe. & Lar.*, 65 : 849-856.
- **PREUD'HOMME J., BELLOC A. C. Y., TARRIDEC P. (1965).** Un antibiotique formé de deux groupes de composants à synergie d'action : la pristinamycine. *Acad. Sci.*, 260 : 1309-1312.
- **PULLEN C., SCHMITZ P., MEUER K., BAMBERG D. D., LOHMAN S., DE CASTRO FRANÇA S. (2002).** New and bioactive compounds from *Streptomyces* strain residing in the wood of Celastraceae. *Planta.*, 16 : 162-167.

- **RADHIKA S., BHARATHI S., RADHAKRISHNAN M., BALAGURUNATHAN R. (2011).** Bioprospecting of Fresh Water Actinobacteria : Isolation, Antagonistic Potential and Characterization of Selected Isolates. *J. of Pharm. Res.*, 8 : 2584-2586
- **RAWASHDEH R., SAADOUN I., MAHASNEH A. (2005).** Effect of culture conditions on xylanase production by *Streptomyces sp.* (strain Ib 24D) and its potential to utilize tomato pomace. *Biotechnol.*, 4 : 251-255.
- **RAMAKRISHNAN N. (1991).** Antibacterial Activities and Modes of Action of Vancomycin and Related Glycopeptides. *Ant. A. Chem.*, 35 : 605-609.
- **REGHIOUA S., BOUGHACHICHE F., OULMI L., ZERIZER H., KITOUNI M., BOUDEMAGH A., BOULAHFROUF A. (2008).** Separation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolés de sol aride de la région de Biskra. *Sci. & Technol.*, 28 : 59-64.
- **REYNOLDS P. E. (1989).** Structure, biochimie et mode d'action de glycopeptides antibiotiques. *Microbiol.*, 8 : 943-950.
- **RIFAAT H. M., EL-SAID O. H., HASSANEIN S. M., SELIM M. S. M. (2007).** Protease activity of some mesophilic Streptomyces isolés from Egyptian habitats. *J. of Cul. Coll.*, 5 : 16-24.
- **RIOS J. L. et RECIO M. C. (2005).** Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology.*, 100 : 80-84.
- **RIPERT C. (2013).** Mycologie médicale. *Tec. et Toc.*, 5 : 64-69.
- **ROSSI-DORIA, T. (1891).** Microbiologie. *Igi. Sper.*, 8 : 339-428.
- **RUSSELL A. D., MAILLARD J. Y. (2000).** Reaction and response: Is there a relationship between antibiotic resistance and resistance to antiseptics and disinfectants among hospital acquired and community-acquired pathogens ? *Am. Control.*, 28 : 204-206.
- **SABAOU N. (1998).** Contribution à l'étude des Actinomycètes des sols des palmeraies Algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat en biotechnologie alimentaire. Université des Sciences et de la technologie Houari Boumediène. Alger.
- **SAFFROY S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en procédés biotechnologiques et alimentaire. Institut national polytechnique. Lorraine.
- **SAHIN N., UCUR A. (2003).** Investigation of the Antimicrobial Activity of Some Streptomyces Isolates. *Biol.*, 27 : 79-84.

- **SALEEM BASHA N., REKHA R., KOMALA M., RUBY S. (2009).** Production of Extracellular Antileukaemic Enzyme L-asparaginase from marine Actinomycetes by solid-state and submerged fermentation, Purification and Characterization. *Trop. J. of Pharm. Res.*, 8 : 353-360.
- **SANASAM S., NINGTHOUJAM D. S. (2010).** Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian Journal of Biotechnology.*, 2 : 139-145.
- **SANGLIER J. J., HAAG H., HUCK T. A., FEHR T. (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol.*, 144 : 633-642.
- **SANGLIER J. J., HAAG H., HUCK T. A., FEHR T. (1996).** Review of actinomycetes compounds 1990 1995. *Dru.*, 5 : 207-223.
- **SANGLIER J. J., TRUJILL M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. *Microbiol.*, 12 : 269-276.
- **SCHMITZER P. R., GRAUPNER R. R., CHAPIN E. L., FIELDS S. C., GILBERT J. R., GRAY J. A. (2000).** Ribofuranosyl Adenylosuccinate Synthetase Following Phosphorylation. *Nat. Prod.*, 63 : 777-781.
- **SCHWEIZER H.P. (2003).** Efflux as mechanism of resistance to antimicrobials in *Pseudomonas aeruginosa* an related bacteria unanswered questions. *Genet. Mol. Res.* 2 : 48-62.
- **SENECA H., KANE J. H., ROCKENBACH J. (1952).** Bactericidal, protozoicidal and fungicidal properties of thiolutin. *Antibiot. Chemother.*, 2: 357-360.
- **SERGIO S., PIRALI G., WHITE R., PARENTI F. (1975).** Lipiarmycin, a new antibiotic from Actinoplanes. *Antibiot.*, 28 : 543-549.
- **SHAPIRO S., VINING L.C. (1985).** Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous culture. *Canadian Journal Microbiology.*,31: 119-123.
- **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. *Trop. J. of Pharm. Res.*, 6 : 801-808.
- **SHEIKH N., JAHAGIRDAR V., KOTHADIA S., NAGOBA B. (2013).** Antifungal Drug Resistance in Candida Species. *Med.*, 10 : 254-258.
- **SHIRLING E. B., GOTTLIEB D. (1966).** Methods for characterization of Streptomyces species. *Sys. Bacteriol.*, 16 : 313-340.
- **SHIRLING E. B., GOTTLIEB D. (1976).** Retrospective evaluation of International *Streptomyces* Project taxonomy criteria. *Arai.*, 22 : 9-42.

- **SHOMURA T, YOSHIDA J, AMANO S, KOJIMA M, INOUE S., NIIDA T. (1979).** Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. *Antibiot.*, 5 : 427-435.
- **SIDDHIKOL C., ERBSTOESZER J. W., WEISBLUM B. (1969).** Mode of action of streptolydigin. *Bacteriol.*, 99 : 151-155.
- **SILVA M. S., SALES A. N., MAGALHÃES-GUEDES K. T., DIAS D. R., SCHWAN R. F. (2013).** Brazilian cerrado soil actinobacteria ecology. *Biomed. Res.*, 10 : 9-32.
- **SIMON P., MEUNIER R. (1970).** Microbiologie industrielle et génie biochimique. *Mass.*, 9 : 6-18.
- **SINGH L. S., MAZUMDER S., BORA T. C. (2009).** Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by salt- tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Mycol.*, 19 : 225-233.
- **SINGLETON P. (1999).** Bactériologie. *Dun.*, 26 : 339- 351.
- **SINGLETON P. (2005).** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. *Dunn. Sci.*, 3 : 65-75.
- **SMAOUI S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en génie de procédés et environnement. Université de Toulouse.
- **SOISSON S. M. (2006).** Platensimycine is a selective Fab F inhibitor with potent antibiotic properties. *Nat.*, 441: 358-361.
- **SPRUSANSKY O., ZHOU L., JORDAN S., WHITE J., WESPELING J. (2003).** Identification of three new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *Bacteriol.*, 185 : 6147–6157.
- **SRIVIBOOL R., SUKCHOTIRATANA M. (2006).** Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils, a new source of antimicrobial producers. *Sci. Technol.*, 28 : 493-499.
- **STACKEBRANDT E., RAINEY F. A., WARD-RAINEY N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system. *Microbiol.*, 47 : 479-491.
- **STANECK J. L., ROBERTS G. D. (1974).** Simplified approach to identification of aerobic actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* 28 : 226-231.
- **STRUB C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université de Toulouse INP-ENSAT.

- **STURDIKOVA M., STURDIK E. (2009).** Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Ch. Slovaca.*, 2 : 63-74.
- **SUELA SILVA M., NAVES SALES A., TEIXEIRA MAGALHÃES-GUEDES K., RIBEIRO DIAN D., SCHWAN R.F. (2013).** Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. *Biomed. Res.*, 13 : 503-805.
- **SULLIVAN K. M., SPOONER L. M. (2010).** Fidaxomicin: a macrocyclic antibiotic for the management of *Clostridium difficile* infection. *Ann. Pharmacother.*, 44 : 352-359.
- **SUPERTI S., DIAS C. A. G., AZEVEDO P. A. (2009).** In vitro Fosfomicin Activity in Vancomycin- Resistant *Enterococcus faecalis*. *Braz. J. of Infe. Dis.*, 13 : 123-124.
- **SUZUKI K., NAGAI K., SHIMIZU Y., SUZUKI Y. (1994).** Search for actinomycetes in screening for new bioactive compounds. *Microbiol.*, 8 : 122-127.
- **SYKES G., SKINNER F. A. (1973).** Actinomycetales : Characteristics and practical importance. *Aca. press.*, 12 : 142-144.
- **TAKAHASHI Y., OMURA S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for screening of new bioactive compounds. *Microbiol.*, 49 : 141-154.
- **TAKAHASHI Y., TAKI A. et OMURA S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for screening of new bioactive compounds. *Microbiol.*, 49 : 141-154.
- **TANAKA Y. (1992).** Fermentation processes in screening for new bioactive substances. *Spri. Verlag.*, 23 : 303-325.
- **TANAKA Y., TAKI A., MASUMA R., OMURA S. (1992).** Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *Antibiot.*, 39 : 813-821.
- **TENOVER F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Med.*, 119 : 3-10.
- **TESIC Z. et LUKIC A. M. (1966).** *Actinomyces coeruleus* Baldacci, producer of an antibiotic of large antifungal spectrum. *Mikrobio.*, 3 : 183-193.
- **THAKUR D., YADAV A., GOGOI B. K. et BORA T. S. (2007).** Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *Microbiol. Médi.*, 17 : 242-249.
- **THEILLEUX J. (1993).** Les actinomycètes, microorganisme d'intérêt industriel. *Lav.*, 12 : 425-479.
- **THUMAR J. T. et SINGH S. P. (2007).** Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces clavugerus* strain Mit-1. *Braz. J. of Microbiol.*, 35 : 422-435.

- **TORTORA GERARD J., FUNKE BERDELL R., CASE CHRISTINE L. (2011).** Introduction à La Microbiologie. *Scie.*, 14 : 420-428.
- **TUSKE S., SARAFIANOS S. G., WANG X., HUDSON B., SINEVA E., MUKHOPADHYAY J., BIRKTOFT J. J., LEROY O., ISMAIL S., CLARK A. D. J., DHARIA C., NAPOLI A., LAPTENKO O., LEE J., BORUKHOV S., EBRIGHT R. H., ARNOLD E. (2005).** Inhibition of bacterial RNA polymerase by streptolydigin: stabilization of a straightbridge- helix active-center conformation. *Cell.*, 122 : 541-552.
- **UNTRAU S., LEBRIHI A., LEFEBVRE G., GERMAIN P. (1994).** Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Micr.*, 28 : 111-118.
- **UYEDA M., MIZUKAMI M., YOKOMIZO K., SUZUKI K. (2001).** Pentalenolactone I and hygromycine A, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygrosopicus*. *Bio. Biotech. Biochem.*, 65 : 4-1252.
- **VALAN ARAZU M., DURAI PANDIYAN V., AGASTIAN P., IGNACIMUTHU S. (2008).** Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J. de Myco. Med.*, 18 : 147-153.
- **VALAN ARAZU M., DURAI PANDIYAN V., AGASTIAN P., IGNACIMUTHU S. (2009).** In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* sp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *Microbiol.*, 45 : 650-670.
- **VAN SOULINGER P., MEYER D., VAN DER KLEY W. A., BARNETT C., BOLLE R., POWER S. D. (2001).** Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. *Extremo.*, 5 : 333-341.
- **VENTURA M., CANCHAYA C., TAUCH A., CHANDRA G., FITZGERALD G. F., CHATER K. F., VAN SINDEREN D. (2007).** Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol.*, 71 : 495-548.
- **VINO S. et LOKESH K. R. (2008).** Borrelidin: A promising anticancer agent from *Streptomyces* species. *J. of Adv. Biotech. Rev.*, 15 : 22-26.
- **VITALE L. (1999).** Aminopeptidase of the Genus *Streptomyces*. *F. Tech and biotech.*, 37 : 29-37.
- **VONOTHINI G., MURIGAN M., SIVAKUMAR K., SUDHA S. (2008).** Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *Biotechnol.* 7 : 3225-3230.
- **WAKSMAN S. A. (1919).** *Soil. Sci.*, 8 : 71-215.

- **WAKSMAN S. A. (1967).** The actinomycetes. *Ron. Press.*,36 : 825-832.
- **WANG J., SOISSON S. M. (2006).** Platensimycine is a selective Fab F inhibitor with potent antibiotic properties. *Nat.*, 441 : 358-361.
- **WATVE M. G., TICKOO R., JOG M. M., BHOLE B. D. (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? *Arch. Microbiol.*, 176 : 386-390.
- **WEHRLI W., STAEHELIN M. (1971).** Actions of the rifamycins. *Bacteriol. Rev.*, 35 : 290-309.
- **WEISBURG W. G., BARNS S. M., PELLETIER D. A., LANE D. J. (1991).** 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *Bacteriol.*, 173 : 697-703.
- **WILLIAMSON N. R., FINERAN C. P., LEEPER F. J., SALMON P. C. (2006).** The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nat. Mic. Rev.*, 4: 89-93.
- **WILLIAMS S. T., CROSS T. (1971).** “Actinomycetes.” In Methods in microbiology. *Aca. Press.*, 4 : 295-334.
- **WILLIAMS S. T., WELLINGTON E. (1982).** Actinomycetes. *Agro. Mono.*, 4 : 53-60.
- **WILLIAMS S. T., GOODFELLOW M., ALDERSON G., WELLINGTON E. M. H., SNEATH P.H.A. et SACKIN M. J. (1983).** Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *Microbiol.*, 129 : 1743–1813.
- **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., PETROLINI B., QUARONI S., TODD J. I., WEST M. (1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Res. Microbiol.*, 144 : 653–656.
- **WHITMAN W. B., GOODFELLOW M., KÄMPFER P., BUSSE H. J., TRUJILLO M. E., LUDWIG, W., SUZUKI K. I. (2012).** Bergey’s manual of systematic bacteriology. Volume 5. *Spinger.*, 56 : 452-461.
- **WRIGHT G. D., BERGHUIS A. M., MOBASHERY S. (1998).** Structures, functions, and resistance. *Plen. Press.*, 9 : 27-69.
- **WRIGHT G. D. (2003).** Mechanisms of resistance to antibiotics. *Biol.*, 7 : 563-569.
- **ZERMAN F. (2008).** Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliqués dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magistère en microbiologie appliquée. Université Mentouri. Constantine.

- **ZERIZER H., OULMI L., BOUGHACHICHE F., REGHIOUA S., BOUDEMAGH A., KITOUNI M., BOULAHROUF A. (2006).** Identification d'une actinomycète, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides de la région de Biskra. *Sci & Tech.*, 24 : 17-22.
- **ZERIZER H. (2014).** Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat en sciences en biochimie et microbiologie appliquée. Université Mentouri. Constantine.
- **ZILI Z., SFAR S., FESSI H. (2005).** Preparation and characterization of poly caprolactone nanoparticles containing griseofulvin. *Pharm.*, 294 : 261–267.
- **ZITOUNI. A. (2005).** Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharoyhrix sp.* SA 103. Thèse de Doctorat en microbiologie appliquée. Université Mouloud Mammeri. Tizi ousou.
- **ZHI X. Y., LI W. J., STACKEBRANDT E. (2009).** An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of igher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Microbiol.*, 59 : 589-608.
- **ZOUAGHI A. (2007).** Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces rimosus*. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage.

ANNEXES

Annexe 1 :**Composition des solutions et milieux de culture utilisés****Milieu Bennett** (composition en g/l)

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

Milieu Bennett (milieu liquide) (composition en g/l)

- Extrait de levure..... 2g.
- Extrait de viande..... 1g.
- Peptone..... 2g.
- Glucose 10g.
- Eau distillée..... 1000 mL.
- pH = 7,2.

Milieu Mueller Hinton (composition en g/l)

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

Milieu Sabouraud (sans chloramphénicol) (composition en g/l)

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

Milieu gélosé à base d'amidon (composition en g/l)

- Amidon.....10g.
- Glucose5g.
- Extrait de levure 2g.
- Extrait de viande1g.
- Peptone.....2g.
- Agar..... 20g.
- Eau distillée..... 1000 mL.
- pH = 7,2 .

Hydrolyse de la caséine (composition en g/l)

- Poudre du lait écrémé.....10g.
- Peptone.....5g.
- Chlorure de sodium (NaCl).....0,03g.
- Agar.....20g.
- Eau distillée.....1000 ml.

Hydrolyse de la caséine (milieu liquide)

- Poudre du lait écrémé 10g.
- Eau distillée 100 ml.

Eau physiologique stérile (composition en g/l)

- Chlorure de sodium (NaCl).....9 g.
- Eau distillée.....1000 ml.
- pH = 7.

Annexe 2 : Résultats des tests statistiques

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamètres (Feuille de données) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	2796,052	1	2796,052	100,4705	0,000000
Souche	56,773	2	28,386	1,0200	0,378601
Erreur	556,592	20	27,830		

Tableau 1 : table de l'ANOVA pour les résultats de l'activité antimicrobienne des trois souches d'actinomycètes.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamètres (Feuille de données) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	894,2602	1	894,2602	3433,960	0,000000
solvant	0,5208	2	0,2604	1,000	0,384734
Erreur	5,4688	21	0,2604		

Tableau 2 : table de l'ANOVA pour les résultats de l'activité des trois extraits organiques de la souche S1.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamètres (Feuille de données) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	1164,827	1	1164,827	160,3229	0,000000
solvant	14,963	2	7,481	1,0297	0,374451
Erreur	152,576	21	7,266		

Tableau 3 : table de l'ANOVA pour les résultats de l'activité des trois extraits organiques de la souche S2.

Effet	Tests Univariés de Significativité pour diamètres (Feuille de données) Paramétrisation sigma-restreinte Décomposition efficace de l'hypothèse				
	SC	Degr. de Liberté	MC	F	p
ord. origine	141,3776	1	141,3776	9,516992	0,005614
solvant	46,7240	2	23,3620	1,572638	0,230975
Erreur	311,9609	21	14,8553		

Tableau 4 : table de l'ANOVA pour les résultats de l'activité des trois extraits organiques de la souche S3.

Annexe 2 : Quelques propriétés physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans notre travail.

Propriétés physico-chimiques	Solvants organiques		
	Chloroforme	Méthanol	Acétate d'éthyle
Formule chimique	CHCl ₃	CH ₃ OH	C ₄ H ₈ O ₂
Masse molaire ¹	119,378	32,042	88,1051
Densité ²	1,47970 ₂₅	0,78637 ₂₅	0,90 ₂₅
Point d'ébullition ³	61,178	64,546	77,1
Tension de vapeur ⁴	25,97 ₂₅	16,937 ₂₅	98,3 ₂₅
Viscosité ⁵	0,5357 ₂₅	0,5531 ₂₅	0,44 ₂₅
Constante diélectrique ⁶	4,80620	32,66 ₂₅	6,00 ₂₅
Point d'éclair ⁷	16	11	-4,4

1. Masse molaire relative, sans unité.

2. g. cm³. La température de référence est indiquée en °C en indice

3. °C à 1 atm.

4. KPa. La température de référence est indiquée en °C en indice.

5. Centipoise. (cP). La température de référence est indiquée en °C en indice.

6. Sans unité. La température de référence est indiquée en °C en indice.