

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou
Faculté des Sciences Biologiques et des Sciences Agronomiques
Département de Biochimie et de Microbiologie



MEMOIRE
EN VUE DE L'OBTENTION DU
DIPLOME DE MASTER EN
MICROBIOLOGIE APPLIQUEE

Présenté par :
BEN YAOU Akli

Thème

ISOLEMENT DE SOUCHES D'ACTINOMYCETES
PRODUCTRICES DE MOLECULES ANTIMICROBIENNES
AU NIVEAU D'UNE SOURCE D'EAU SITUEE DANS LA
REGION DE TIZI-OUZOU

Soutenu le : 20 / 09 / 2015

Devant le jury :

Président :	Mr AMROUCHE T.	Maitre de Conférences A.	UMMTO
Promoteur :	Mr OUELHADJ A.	Maitre de Conférences A.	UMMTO
Examineur :	Mr BOUAZZA B.	Maitre Assistant B.	UMMTO
Examineur :	Mr MEDJKOUN N.	Maitre Assistant B.	UMMTO

Remerciements

Mes sincères remerciements ainsi que ma profonde gratitude vont :

A mon promoteur, Mr OUELHADJ A. pour le suivi, l'orientation et l'intérêt qu'il m'a accordé durant la réalisation de mon mémoire de master.

Aux membres du jury qui ont accepté d'examiner mon travail.

A ma famille qui m'a tant soutenu et encouragé durant toutes ces longues années d'études.

A mes chers ami(e)s et camarades pour leurs encouragements et leur soutien.

A tous ceux qui m'ont aidé, de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Je dédie ce travail :

A ma très chère mère, et à mon très cher père.

A ma sœur Thiziri ainsi qu'à mes deux frères Mohamed et Hacene.

A mes ami(e)s et camarades, ainsi qu'à tous ceux qui m'ont encouragé dans la réalisation de ce travail.

A tous ceux qui m'ont inspiré (éminents scientifiques, enseignants, hommes et femmes de bonne volonté).

SOMMAIRE

INDEX DES TABLEAUX ET FIGURES

LISTE DES ABREVIATIONS

INTRODUCTION.....1

CHAPITRE I : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE.....3

I. LES ACTINOMYCETES.....3

1. Généralités.....3

2. Culture et morphologie des actinomycètes.....3

2.1. Le mycélium.....6

2.2. La spore.....7

2.3. Autres structures.....8

3. Classification et critères d'identification.....8

3.1. Critères morphologiques.....9

3.1.1. Critères macromorphologiques et culturels.....9

3.1.2. Critères micromorphologiques.....9

3.2. Critères chimio-taxonomiques.....11

3.2.1. Les sucres11

3.2.2. Les acides aminés.....12

3.2.3. Les lipides.....14

3.3. Critères physiologiques.....15

3.4. Critères moléculaires.....15

3.4.1. Séquençage de l'ARNr 16S.....15

3.4.2. Coefficient de Chargaff.....17

4. Ecologie et distribution dans la nature.....18

5. Intérêt biotechnologique des actinomycètes.....20

II. ANTIBIOTHERAPIE ET BACTERIO-RESISTANCE.....24

1. Notions générales sur les antibiotiques.....24

2. Notions sur la résistance bactérienne.....26

2.1. Définition.....26

2.2. Base génétique de la résistance.....27

2.2.1. Résistance naturelle.....27

2.2.2. Résistance acquise.....28

2.3.	Origine des gènes de résistance.....	29
2.4.	Mécanismes de résistance.....	29
2.4.1.	Mutation de la cible de l'antibiotique.....	29
2.4.2.	Modification de la cible de l'antibiotique.....	30
2.4.3.	Surexpression de la cible de l'antibiotique.....	30
2.4.4.	Modification de l'antibiotique.....	30
2.4.5.	Réduction de la perméabilité membranaire.....	30
2.4.6.	Résistance par efflux.....	30
2.4.7.	Défense altruiste.....	31
3.	Epidémiologie de la résistance aux antimicrobiens.....	31

CHAPITRE II : MATERIEL ET METHODES.....35

I. ECHANTILLONNAGE.....35

1.	Choix du type d'échantillon.....	35
2.	Choix du site d'échantillonnage.....	35
3.	Méthode de prélèvement.....	37

II. CULTURE ET ISOLEMENT.....37

1.	Prétraitement de l'échantillon.....	39
1.1.	Dessiccation à l'air.....	39
1.2.	Traitement au carbonate de calcium.....	40
1.3.	Traitement par le Stockage.....	40
1.4.	Traitement thermique.....	41
2.	Préparation des suspensions.....	41
3.	Mise en culture.....	42
4.	Isolement des souches représentatives.....	42

III. RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....42

1.	Choix des microorganismes cible.....	42
2.	Criblage de l'activité antibactérienne.....	43
2.1.	Criblage primaire par la technique des stries perpendiculaires.....	43
2.2.	Criblage secondaire par la technique des cylindres d'agar.....	43
3.	Criblage de l'activité antifongique.....	43

IV. SELECTION DES ACTINOMYCETALES BIOACTIVES ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES REPRESENTATIVES.....44

1.	Sélection des actinomycétales parmi les isolats ayant montré une activité antimicrobienne	44
1.1.	Préparation des frottis.....	44
1.2.	Coloration de Gram.....	45
2.	Caractérisation partielle des souches sélectionnées.....	46
2.1.	Critères morphologiques.....	46
2.2.	Critères biochimiques.....	46
CHAPITRE III : RESULTATS ET DISCUSSION.....		51
I.	DENOMBREMENT DES COLONIES.....	51
1.	Premier essai.....	51
2.	Second essai.....	52
II.	ISOLEMENT DES SOUCHES REPRESENTATIVES.....	59
III.	CRIBLAGE DE L'ACTIVITE ANTIMICROBIENNE.....	65
1.	Criblage de l'activité antibactérienne.....	65
1.1.	Criblage primaire.....	65
1.2.	Criblage secondaire.....	67
2.	Criblage de l'activité antifongique.....	75
IV.	SELECTION DES ACTINOMYCETALES BIOACTIVES ET CARACTERISATION BIOCHIMIQUE DES SOUCHES REPRESENTATIVES.....	76
1.1.	Sélection des actinomycétales parmi les isolats ayant montré une activité antimicrobienne	76
1.2.	Caractérisation biochimique des souches représentatives.....	77
1.2.1.	Sélection des souches représentatives.....	77
1.2.2.	Caractérisation biochimique.....	78
CONCLUSION.....		85
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....		88

Index des tableaux

Titre	Page
Tableau I : Synthèse des principaux caractères fongiques et bactériens des actinomycètes.	4
Tableau II : Sucres cellulaires totaux des actinomycètes.	12
Tableau III : Types de parois des actinomycètes en fonction des constituants en acides aminés et en sucres.	13
Tableau IV : Différentes valeurs de G+C% rencontrées dans le groupe des Actinomycètes.	17
Tableau V : Répartition des actinomycètes dans la nature.	18
Tableau VI : Répartition des actinomycètes dans la nature.	19
Tableau VII : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 souches issus de 16 sols différents.	19
Tableau VIII : Bioactivité des métabolites isolés à partir d'actinomycètes entre 1990 et 1994.	21
Tableau IX : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.	23
Tableau X : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement thermique (premier essai).	51
Tableau XI : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon ayant subi un traitement thermique (premier essai).	52
Tableau XII : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement thermique (second essai).	53
Tableau XIII : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon ayant subi un traitement thermique (second essai).	53
Tableau XIV : Comparaison entre le dénombrement des unités formant colonies du premier et du second essai à la dilution 10^{-3} .	55
Tableau XV : Tableau synthétique des différents caractères macromorphologiques et cultureux des 27 isolats.	60
Tableau XV (suite) : Tableau synthétique des différents caractères macromorphologiques et cultureux des 27 isolats.	61
Tableau XVI : Résultats du criblage primaire des 27 isolats contre les 3 bactéries test.	66

Tableau XVII : Résultats du criblage secondaire des 27 isolats contre les 3 bactéries test via la technique des cylindres d'agar.	68
Tableau XVIII : Résultats du criblage tertiaire (répétition) des 27 isolats contre les 3 bactéries test via la technique des cylindres d'agar. Diamètres d'inhibition en mm.	69
Tableau XIX : Coefficients de variation (CV) des diamètres d'inhibition calculés entre le criblage antibactérien secondaire et tertiaire pour chacun des isolats contre les trois bactéries test.	71
Tableau XX : Résultats de l'observation à (Gx100) après coloration de Gram.	77
Tableau XXI : Sélection de 5 souches selon les critères de pureté, du spectre d'activité et de l'amplitude des diamètres d'inhibition.	78
Tableau XXII : Tableau synthétique de quelques caractères biochimiques de cinq souches d'actinomycètes productrices de molécules antimicrobiennes.	82

Index des figures

Figure 1 : Cycle de développement et structures d'une colonie d'actinomycètes (genre <i>Streptomyces</i>) sur milieu solide.	5
Figure 2 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.	5
Figure 3 : Organisation des conidies chez quelques genres d'actinomycètes.	10
Figure 4 : Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes.	11
Figure 5 : Variabilité des chaînes peptidiques du peptidoglycane chez les actinomycètes.	13
Figure 6 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S.	16
Figure 7 : Pourcentage d'organismes vivants producteurs d'antibiotiques.	21
Figure 8 : Répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les <i>Streptomyces</i> et genres apparentés et d'autres genres d'actinomycétales.	22
Figure 9 : L'âge d'or de la découverte des antibiotiques d'après HOPWOOD (2007).	26
Figure 10 : Localisation géographique de la zone d'échantillonnage.	36

Figure 11 : Site d'échantillonnage : source Amezyav ath Yaou, Ain El Hammam, Tizi-Ouzou.	37
Figure 12 : Synthèse du protocole d'isolement sélectif appliqué.	38
Figure 13 : Protocole de criblage.	44
Figure 14 : Diversité phénotypique au niveau des boîtes de culture issues du second essai. (A) boîte de culture issue de la dilution 10^{-3} . (B) boîte de culture issue de la dilution 10^{-5} .	54
Figure 15 : Moyenne des unités formant colonie par milieu de culture.	54
Figure 16 : Histogramme comparatif des moyennes UFC par milieu de culture à la dilution 10^{-3} lors des deux essais.	55
Figure 17 : Quelques isolats observés à l'œil nu et au microscope photonique au grossissement (Gx10).	62
Figure 17 (suite) : Quelques isolats observés à l'œil nu et au microscope photonique au grossissement (Gx10).	63
Figure 18 : Inhibition <i>in vitro</i> de quelques isolats vis-à-vis des bactéries test selon la méthode de criblage des stries perpendiculaires.	67
Figure 19 : Moyenne des diamètres d'inhibition obtenus lors des criblages antibactériens secondaire et tertiaire (répétition) réalisés selon la méthode des cylindres d'agar (diamètre des cylindres = 8mm).	70
Figure 20 : Inhibition <i>in vitro</i> de quelques isolats vis-à-vis des bactéries test selon la méthode de criblage des cylindres d'agar.	72
Figure 21 : Nombre d'isolats montrant une activité antibactérienne lors des trois criblages.	72

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	Acide ribonucléique.
ARNr	Acide ribonucléique ribosomal.
ATCC	American type culture collection.
BAAR	Bactérie acido-alcool-résistante.
C	Cytosine.
<i>C.albicans</i>	<i>Candida albicans</i> .
CMB	Concentration minimale bactériostatique.
CMI	Concentration minimale inhibitrice.
CV	Coefficient de variation.
DAB	Acide diaminobutyrique.
DAP	Acide diaminopimélique.
EBLSE	Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu.
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i> .
EPE	Eau peptonée exempte d'indole.
G	Guanine.
g	Gramme.
GLM	Gélose à l'extrait de levure et à l'extrait de malt.
h	Heure.
In	Indénombrable.
INSERM	Institut national de la santé et de la recherche médicale.
MA	Mycélium aérien.
MEVAG	Milieu pour l'étude de la voie d'attaque des glucides.
mg	Milligramme.
MK	Ménaquinones.
ml	Millilitre.
mm	Millimètre.
MS	Mycélium du substrat.
ND	Non déterminé.
NR	Nitrate réductase.
OMS	Organisation mondiale de la santé.
ONPG	Ortho-nitrophényl- β -galactoside.
<i>P.aeruginosa</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .
PCR	Polymerase Chain Reaction.
pH	Potentiel hydrogène.
PS	Pigments solubles.
RM	Rouge de méthyl.
SARM	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méticilline.
SARV	<i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la vancomycine.
<i>S.aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> .
Sp.	Espèce.
TSI	Triple Sugar Iron.
UFC	Unité formant colonie.
VP	Voges-Proskauer.
μ m	Micromètre.

Introduction

La principale source d'antimicrobiens est représentée par les microorganismes qui, depuis longtemps font l'objet de nombreuses recherches et ont permis et permettent encore la découverte de métabolites secondaires d'intérêt exploitables par l'homme.

Les actinomycètes constituent un groupe fort utile dans le domaine des biotechnologies. Leur hétérogénéité biochimique, 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.

L'arsenal pharmaceutique actuel est en grande partie dérivé de produits naturels issus des actinomycètes. On leur attribue en effet plus de 90% des antibiotiques actuellement utilisés ainsi qu'environ deux tiers de l'ensemble des substances bioactives découvertes (HAMAKI *et al.*, 2005). Cependant, le taux de découverte de nouveaux composés produits par des actinomycètes ne cesse de diminuer, alors que le taux de ré-isollement de souches produisant des composés connus augmente de plus en plus (FENICAL *et al.*, 1999).

Malgré la révolution apportée par les antibiotiques dans le domaine de la médecine et la découverte de milliers de composés, les maladies infectieuses restent un problème de santé publique majeure. Ceci s'explique notamment par l'apparition de souches multirésistantes vis-à-vis de ces composés (VAN DER WAAIJ et NORD, 2000).

La biodiversité microbienne au niveau de niches écologiques diverses constitue un réservoir encore sous-exploité aux potentialités prometteuses dans le domaine des biotechnologies. L'exploration et la valorisation de cette biodiversité revêt donc une importance capitale, notamment dans la recherche d'outils thérapeutiques pouvant répondre à des problématiques de santé publique majeures telle que l'émergence et la propagation des bactéries multi-résistantes.

Les sols sont également considérés comme étant les principaux pourvoyeurs en antibiotiques de par la grande richesse et diversité des populations microbiennes qui y résident (WHITMAN *et al.*, 1998 ; DANIEL, 2004). Il a en effet été démontré qu'un échantillon de sol d'à peine une trentaine de grammes pouvait contenir à lui seul plus de 500 000 espèces différentes (DOOLITTLE, 1999). De plus, selon WATAVE *et al.* (2001), près de 90% de la diversité microbienne dans les sols reste inexplorée.

Dans cette optique, nous avons décidé que notre échantillonnage allait toucher les abords d'une source et ses alentours. La source choisie, connue sous le nom de « Amezyav Ath Yaou », elle-même faisant partie d'un vaste réseau de sources dans la région connu sous le nom de « Lemzayev », se situe en contrebas de la localité d'Ighil Bougueni (commune d'Ain El Hammam, wilaya de Tizi-Ouzou) à la périphérie d'une zone forestière.

L'objectif de la présente étude est double : nous voulons d'une part isoler des souches d'actinomycétales éventuellement productrices de nouvelles molécules antimicrobiennes, et, d'autre part, par un certain nombre d'itérations au niveau du mode opératoire, tenter de dégager un model expérimental type permettant l'isolement de ces micro-organismes sans avoir recours à l'utilisation de substances inhibitrices.

En effet, le problème des protocoles d'isolement sélectif des actinomycètes reste le développement de contaminants, à l'image des bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile, voire impossible. L'addition d'antibiotiques et d'antifongiques permet de réduire de façon considérable le nombre de ces contaminants, mais certains de ces antimicrobiens ne sont pas sans effets sur certaines espèces d'actinomycètes (KITOUNI, 2007).

Pour pallier à ce manque nous avons jugé important de ne pas faire usage de substances inhibitrices, nous avons donc privilégié l'utilisation de méthodes de traitement relativement peu agressives lors de notre isolement.

Après l'étape d'isolement, nous effectuons un criblage antimicrobien contre trois souches bactériennes de référence et une souche fongique. Un certain nombre d'isolats ayant montré une activité antimicrobienne significative et dont l'affiliation au groupe des actinomycètes a été confirmée sont par la suite retenus pour caractérisation biochimique.

Synthèse bibliographique

I. Les actinomycètes

1. Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, à coloration Gram positive (NANJWADE *et al.*, 2010), dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (EUNICE et PROSSER, 1983), celles-ci sont constituées d'hyphes, filaments irradiant par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (GOTTLIEB, 1973 ; LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1981 ; EUNICE et PROSSER, 1983). Ce profil morphologique des plus singuliers les faisant ressembler à des champignons filamenteux est aussi à l'origine de la dénomination « Actinomycètes » (provenant de deux substantifs Grecs : aktinos = rayons, et mykês = champignons), signifiant « champignons à rayons » ou « champignons rayonnants » (GOTTLIEB, 1973).

Les actinomycètes ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et considérés comme étant des champignons primitifs, du fait de leur morphologie parfois fongicoïde (BAKER *et al.*, 1965 ; REPONEN *et al.*, 1998).

2. Culture et morphologie des actinomycètes

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes (PRESCOTT *et al.*, 2013). 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, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, les actinomycètes forment, en une semaine environ, 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).

Tableau I : Synthèse des principaux caractères fongiques et bactériens des actinomycètes.

Caractères fongiques	Références
- Présence de filaments mycéliens ramifiés	BAKER <i>et al.</i> , 1965
- Fructification par sporange libérant des spores chez bon nombre d'entre eux.	REPONEN <i>et al.</i> , 1998
- Certaines souches pathogènes provoquent des maladies à l'allure mycosique.	GAZENKO <i>et al.</i> , 1998
Caractères bactériens	Références
- Cytologie identique à celle des bactéries.	LARPENT et SANGLIER, 1989
- Sensibilité aux bactériophages.	MARIAT et SEBALD, 1990
- Sensibilité aux antibiotiques antibactériens et résistance aux antifongiques.	
- Synthèse de la lysine par la voie de l'acide diaminopimélique.	MARIAT et SEBALD, 1990
- Paroi cellulaire contenant du peptidoglycane.	LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1985
- Affinité immunologique avec les bactéries.	VOLLMER, 2008
- La paroi cellulaire des hyphes du mycélium aérien est typique à celle des bactéries à coloration de Gram positive.	MARIAT et SEBALD, 1990
- L'analyse de leur génome confirme leur appartenance au règne des bactéries.	STACKEBRANDT, 1997

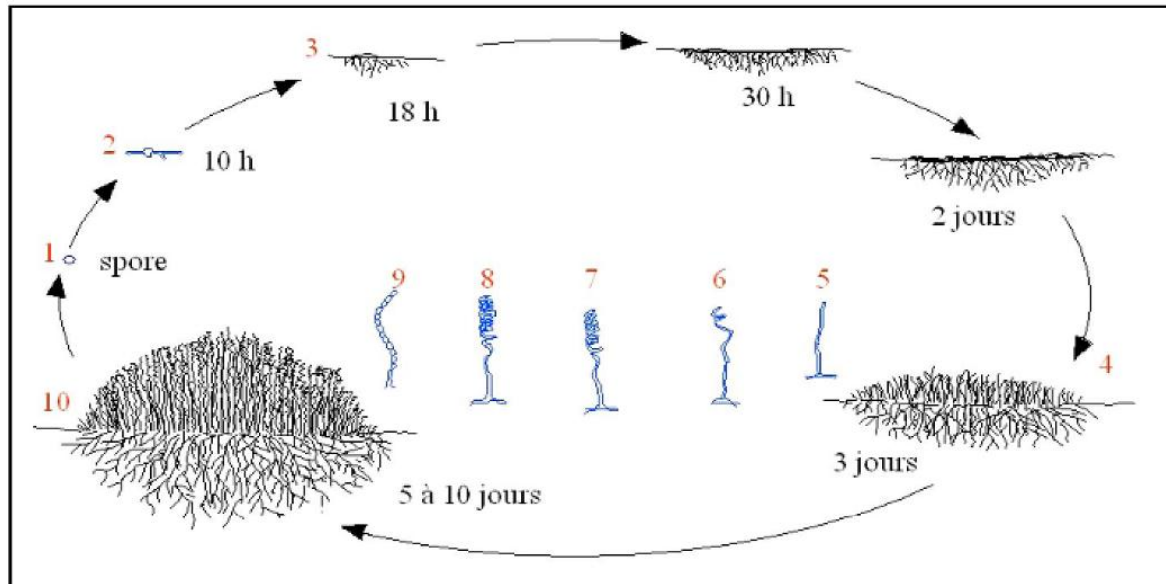


Figure 1 : Cycle de développement et structures d'une colonie d'actinomycètes (genre *Streptomyces*) sur milieu solide. 1 : spore, 2 : tube germinal, 3 : mycélium végétatif, 4 : jeune colonie, 5 : mycélium aérien, 6 : sporophore, 7 : sporulation, 8 et 9 : maturation des spores, 10 : colonie mature (HOPWOOD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

En culture liquide 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 *Streptomyces* 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. Les cellules du centre étant privées de nutriment, les agrégats grossissent.

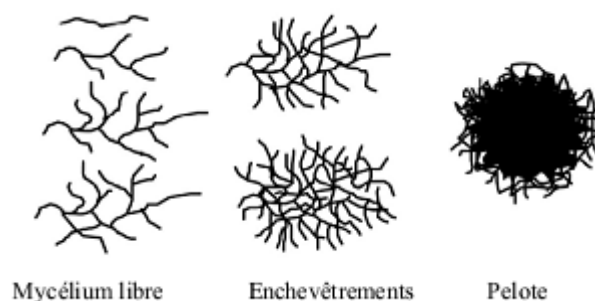


Figure 2 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (AMANULLAH *et al.*, 2000).

2.1. Le mycélium

Le mycélium des actinomycètes présente une grande diversité de morphologies. On rencontre donc :

- des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*) ;
- d'autres au mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*) ;
- et enfin des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces* (DJABALLAH, 2010).

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 multi-nucléaires formés à partir du tube germinal (hyphe) issue 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).

Le mycélium aérien se forme lorsque la colonie devient plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées 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).

En fonction du genre, les mycélia (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 mûré en conidies (exemple : *Streptomyces*) ;

- soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachés au substratum par des crampons (DJABALLAH, 2010).

2.2. La spore

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 des conditions défavorables (SAFFROY, 2006).

Beaucoup d'actinomycètes qui forment des hyphes, produisent des exospores par séptation et fragmentation des hyphes, ces spores sont dépourvues de structures spécialisées, mais font néanmoins preuve de résistance notamment vis-à-vis de la chaleur sèche, de la dessiccation, et de certains produits chimiques (PELMONT, 1994).

Les endospores quant à elles sont produites par des actinomycètes thermophiles et sont semblables, morphologiquement et chimiquement, à celles des *Bacillaceae*. Elles contiennent une paroi externe épaisse, multicouche et résistante, qui enveloppe le cortex, la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde. Elles contiennent aussi de l'acide dipicolinique.

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, avec piquants 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 permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques.

2.3. Autres structures

Quelques genres d'actinomycètes forment des structures rares comme :

- des vésicules appelés sporanges, contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé. Ils sont présents chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium* (THEILLEUX, 1993) ;
- des masses de spores résultant d'une division dans plusieurs plans (au lieu de la division perpendiculaire à l'extrémité des hyphes), ces structures sont appelées sporanges multiloculaires ;
- des structures sphériques sur les hyphes aériens pouvant contenir des hyphes en matrice amorphe ;
- des sclérotes qui sont des structures sphériques compactes de mycélium, formées chez quelques espèces de *Streptomyces*, ils ne contiennent pas de spores mais des cellules enfilées avec des lipides ;
- des synnématas qui sont un ensemble de conidiophores, dressés et consolidés ensemble, pouvant former des conidies uniquement à leur apex, ou bien à leurs apex et bords latéraux (HASEGAWA *et al.*, 1978 ; HOLT *et al.*, 1994).

3. Classification et critères d'identification des actinomycètes

Les actinomycètes appartiennent à la classe des actinobacteria. Celle-ci regroupe à elle seule 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens (STACKEBRANDT, 1997 ; VENTURA, 2007 ; ZHI, 2009).

La caractérisation et l'identification des actinomycètes reposent sur un ensemble de données phénotypiques et génotypiques devant être rassemblées afin de déterminer le genre et l'espèce (voire la sous-espèce) de celles-ci. Cette caractérisation polyphasique repose sur les techniques classiques qui sont l'étude de la culture, de la morphologie, de la physiologie, de la chimio-taxonomie et les méthodes génotypiques.

3.1. Critères morphologiques

3.1.1. Critères macromorphologiques et cultureux

- la présence (cas de nombreux genres) ou non (le genre *Sporichthya*) de mycélium végétatif (aussi appelé mycélium du substrat ou primaire) ;
- la présence (cas de nombreux genres) ou non (ex : *Actinoplanes*, *Micromonospora* et *Rhodococcus*) de mycélium aérien (aussi appelé mycélium secondaire) ;
- la production de pigments diffusibles ;
- la couleur du mycélium végétatif et du mycélium aérien.

3.1.2. Critères micromorphologiques

- la présence de sporanges (ex : *Frankia*, *Dactylosporangium*), de sclérotés (ex : le genre *Chainia*, quelques espèces de *Streptomyces*) ou de synnémates (ex : *Actinosynnema*) ;
- la forme et la dispersion et la taille des sporanges (si présents) ;
- la fragmentation ou non du mycélium végétatif ;
- la présence de spores sur le mycélium végétatif et/ou aérien ;
- la forme des spores, leur agencement (en chaîne ou isolées), leur ornementation (lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu), et leur position sur les hyphes (LARPENT et SANGLIER, 1989) ;
- l'organisation spatiale des chaînes sporales qui peuvent être droites, flexueuses, spiralées ou verticillées, ainsi que le nombre de spores composant ces chaînes selon qu'elles soient monosporés (ex : *Micromonospora*, *Thermomonospora*) oligosporés (ex : *Microbispora*, *Microtetrastpora*) ou polysporés (ex : *Streptomyces*) (HÜTTER, 1967) ;
- mobilité de la spore (ex : *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora*, *Actinoplanes*) ;
- la formation d'endospores (ex : *Thermoactinomyces*)
- la disposition des hyphes du mycélium du substrat et/ou du mycélium aérien.

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

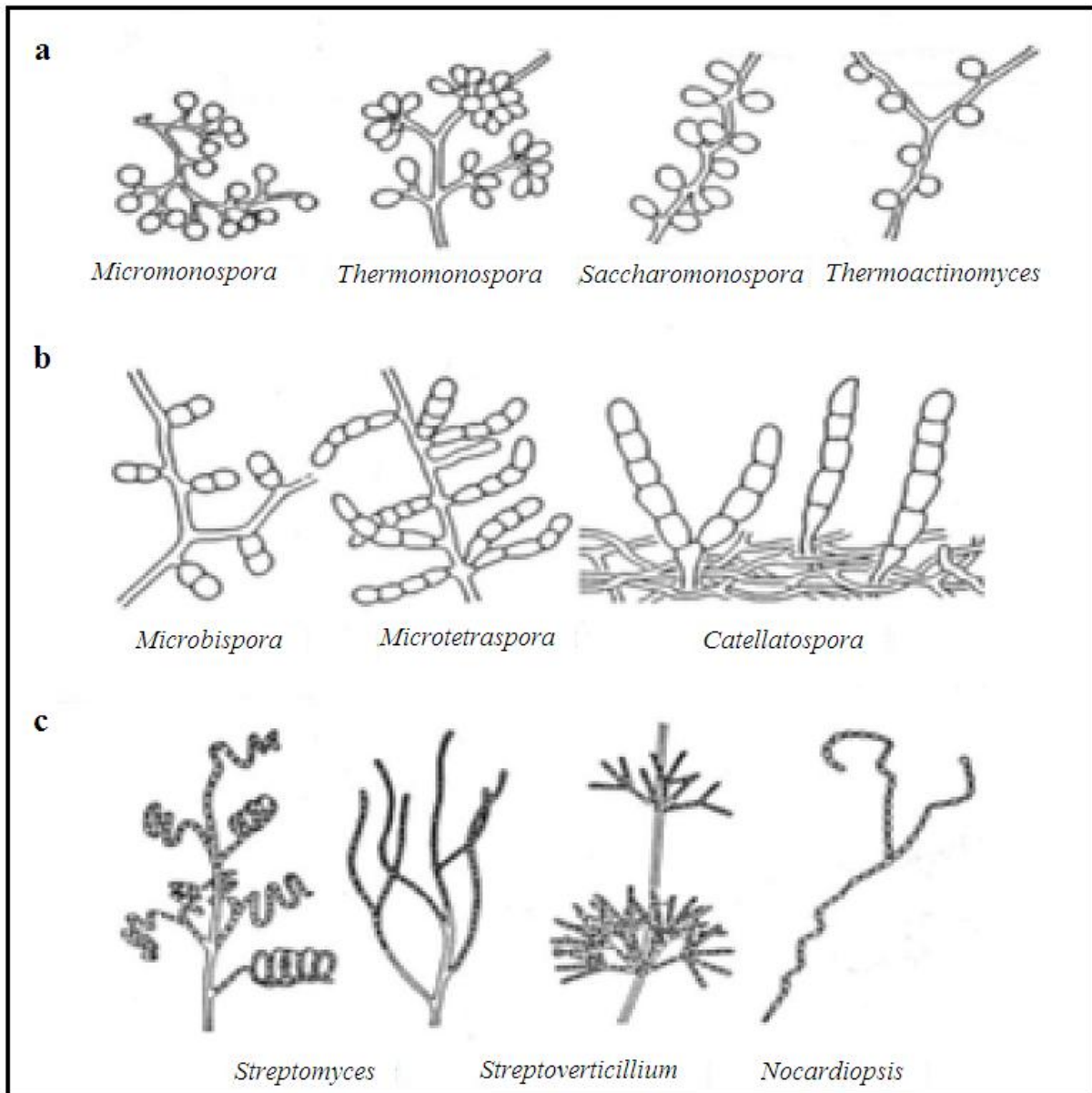


Figure 3 : Organisation des conidies chez quelques genres d'actinomycètes. a: une seule, b: paires ou chaînes courtes, c: longues chaînes (LARPENT et SANGLIER, 1989).

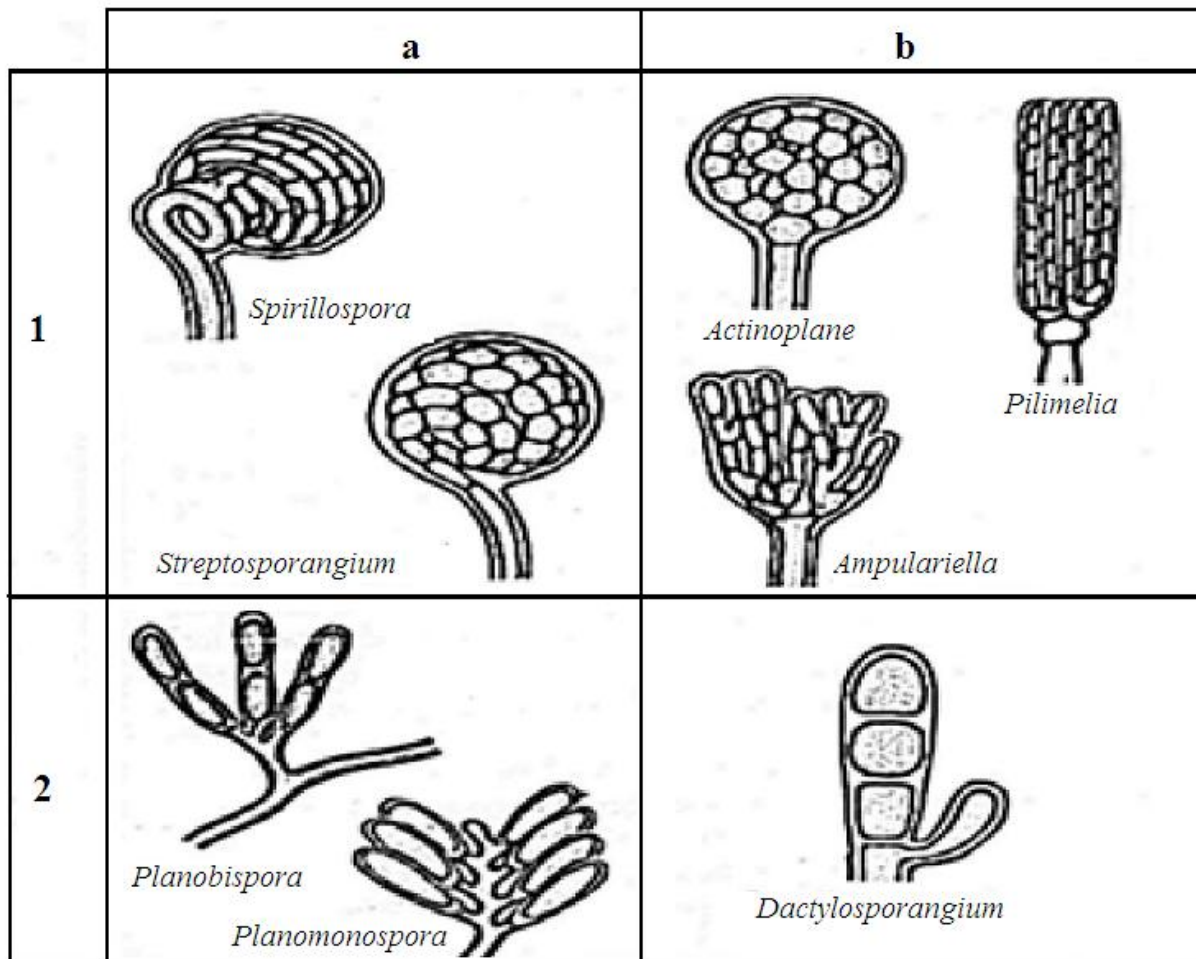


Figure 4 : Formes et disposition de sporanges chez quelques genres d'actinomycètes. a : sur le mycélium aérien, b : sur le mycélium végétatif, 1: spores nombreuses, 2: spores en nombres limités (LARPENT et SANGLIER, 1989).

3.2. Critères chimio-taxonomiques

La composition chimique de la paroi cellulaire des actinomycètes est un outil pratique pour leur taxonomie, elle se montre surtout efficace pour délimiter les genres. La composition en acides aminés, en glucides et en lipides constitue la principale caractéristique utilisée en chimio-taxonomie (STANECK et ROBERTS, 1974 ; LECHEVALIER *et al.*, 1977).

3.2.1. Les sucres

Les sucres ayant une importance taxonomique sont l'arabinose, le galactose, le xylose et le madurose (LECHEVALLIER et LECHEVALLIER, 1970). 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 : Sucres cellulaires totaux des actinomycètes (LECHEVALLIER et LECHEVALLIER, 1970).

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

Cependant, la paroi de certains actinomycétales 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).

3.2.2. Les acides aminés

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée d'un peptidoglycane dont les chaînes peptidiques sont composées d'acides aminés très diverses, dont, 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 (mésos), l'acide 2,4-diaminobutyrique (DAB) et la glycine. La combinaison du type d'acide aminé du peptidoglycane et du spectre de glucides permet un classement en 8 groupes principaux (LECHEVALLIER et LECHEVALLIER, 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, Madurose ou aucun sucre	<i>Actinomadura</i>
IV	Méso-DAP, Arabinose, Galactose	<i>Actinomyces 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-diaminobutyrique

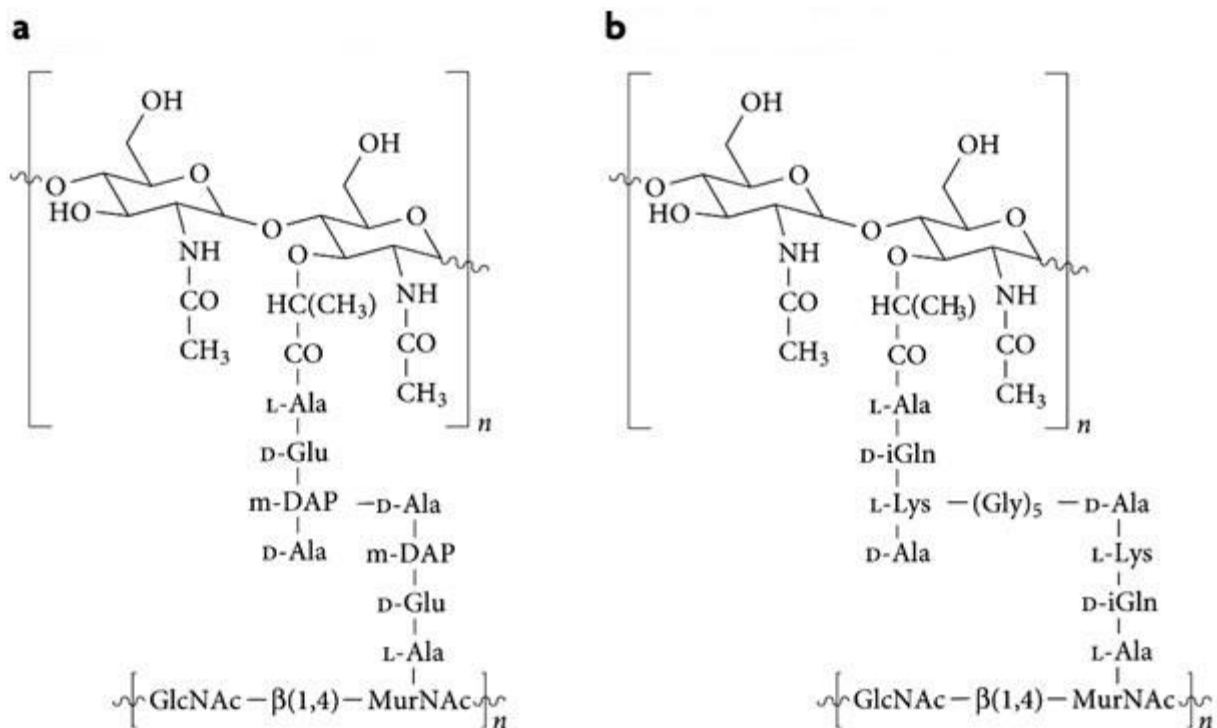


Figure 5 : Variabilité des chaînes peptidiques du peptidoglycane chez les actinomycètes. a. Peptidoglycane contenant de l'acide diaminopimélique en configuration méso (m-DAP) ; b. Peptidoglycane contenant de la lysine, ainsi que de la glycine au niveau du pont reliant les deux chaînes peptidiques (ROYET et DZIARSKI, 2007).

3.2.3. Les lipides

Les lipides constitutifs de la paroi cellulaire importants en taxonomie peuvent être divisés en trois groupes :

- Les acides gras :

Les acides gras qui constituent la paroi des actinomycètes sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, des molécules saturées ou insaturées avec la présence éventuelle de groupes cyclopropane. Les plus communs chez les actinomycètes appartiennent soit à un groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone (ex : genres *Streptomyces*, *Actinomadura*, *Micromonospora*), soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*. Les types d'acides gras et le nombre d'atomes de carbone les composant est caractéristique du genre, à titre d'exemple les acides mycoliques sont présents uniquement chez certains genres tels que *Nocardia* (de 46 à 60 atomes de carbone), *Mycobacterium* (80 atomes de carbone), *Corynebacterium* (30 atomes de carbone) etc. (MINNIKIN et GOODFELLOW, 1981).

- Les ménaquinones :

Les ménaquinones (MK) sont des quinones isoprénoïdes présentes au niveau de la membrane plasmique et jouent un rôle dans le transport d'électrons et dans la phosphorylation oxydative. Elles sont classées en fonction du nombre d'unités isoprène et du degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (COLLINS *et al.*, 1980). A titre d'exemple, le genre *Nocardioïdes* se caractérise par du MK-8(H4), le genre *Streptomyces* synthétise principalement du MK-9(H6) et le genre *Thermoactinomyces* est caractérisé par la présence de MK-7 (MINNIKIN et GOODFELLOW, 1981).

- 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) tels que *Pseudonocardia* et *Amicolatopsis* (LECHEVALIER *et al.*, 1986), *Nocardioïdes* et *Saccharothrix* (LABEDA *et al.*, 1984).

3.3. Critères physiologiques

Les tests utilisés consistent en la capacité des actinomycètes à :

- hydrolyser divers composés organiques tels que l'amidon, la caséine, l'esculine, la gélatine, le Tween 80, la tyrosine, la xanthine, etc. ;
- utiliser ou non des composés glucidiques ou leurs dérivés comme seule source de carbone tels que l'arabinose, le fructose, le galactose, le glucose, le lactose, le maltose, le mannitol, le mannose, le raffinose, le rhamnose, le saccharose, le xylose, etc. ;
- décarboxyler ou non les sels de sodium : acétate, pyruvate, succinate, etc. ;
- tolérer ou non différents agents physiques tels que la température, le pH et les agents chimiques tels que le chlorure de sodium, le lysozyme, le phénol, etc., ainsi que divers antibiotiques à des concentrations bien précises.

3.4. Critères moléculaires

Des techniques plus récentes ont été appliquées à la taxonomie des actinomycètes. Les méthodes basées sur la PCR avaient apporté une voie rapide et fiable pour l'identification des bactéries y compris les actinomycètes.

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%).

3.4.1. Séquençage de l'ARNr 16S

L'ARNr 16S est l'outil principal utilisé pour l'identification des actinomycètes. Les ARNr étant essentiels à la bactérie et ayant un rôle fonctionnel identique pour tous les ribosomes, leur structure évolue très lentement au cours du temps, vraisemblablement en raison de leur rôle critique et constant dans la physiologie bactérienne. Le gène codant de l'ARN ribosomal 16S présente ainsi à la fois des régions hautement conservées tout en contenant de courtes séquences signature spécifiques de genre et parfois d'espèces. Ces caractéristiques particulières font de ce gène une cible intéressante.

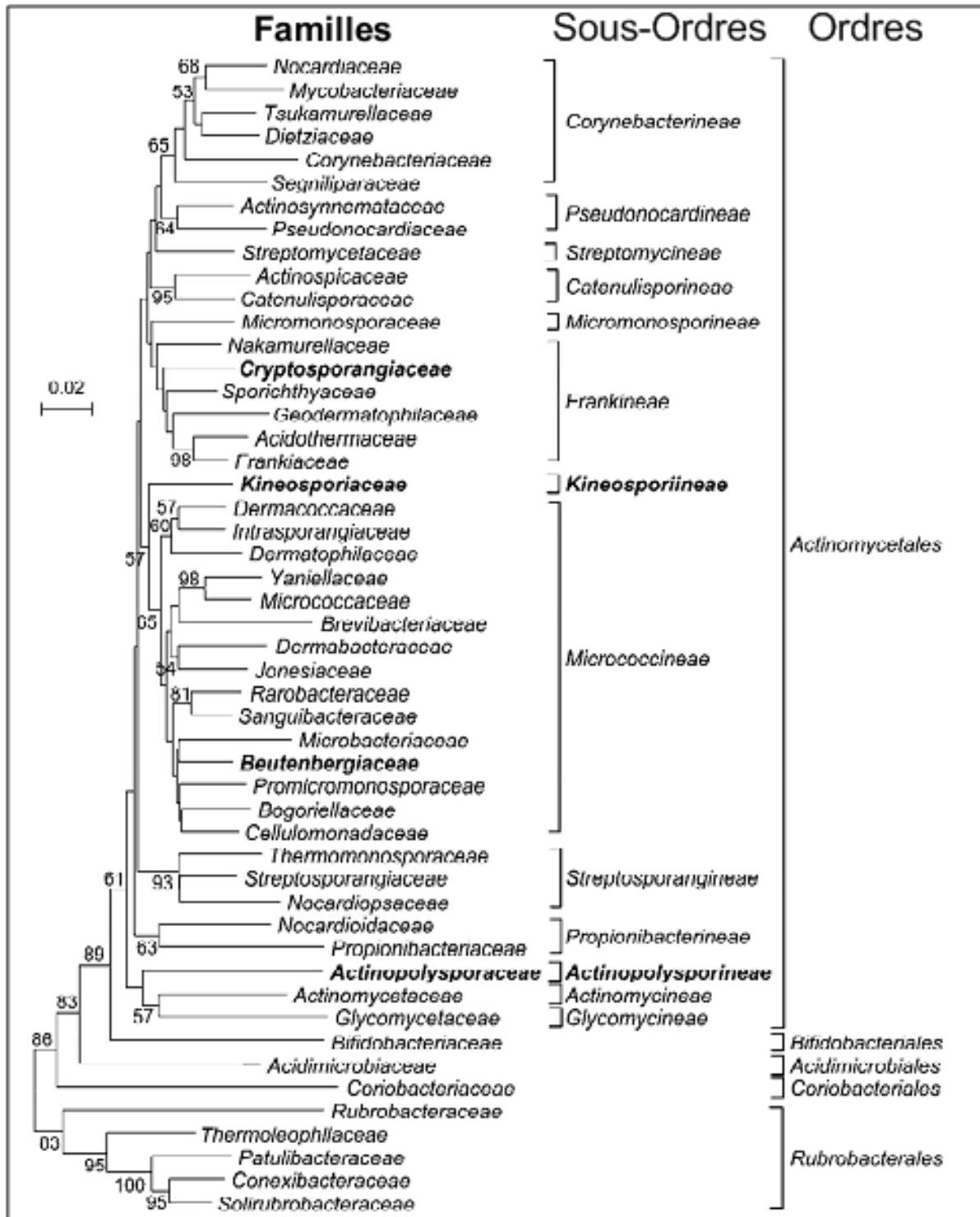


Figure 6 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (ZHI, 2009).

3.4.2. Coefficient de Chargaff

En 1949, CHARGAFF et ses collaborateurs ont montré que le contenu en bases puriques et en bases pyrimidiques de l'ADN pouvait varier d'un individu à un autre mais était constant pour les individus d'une même espèce. En effet, on admet que des microorganismes dont les G+C% diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce, et que des microorganismes, dont le G+C%, diffèrent de plus de 10% ne peuvent appartenir au même genre. Bien entendu, des valeurs identiques n'impliquent pas que les bactéries sont proches car les bases peuvent être distribuées de manière très différente sur l'ADN. Chez les bactéries, cette valeur est très dispersée et varie de 25 à 75 % ; en revanche, chez les actinomycètes, celle-ci est généralement comprise entre 60 et 75 % (WILLIAMS *et al.*, 1989 ; LARPENT et SANGLIER, 1989; CHUN *et al.*,1997). Le tableau suivant regroupe les valeurs de C+G% rencontrés chez quelques genres d'actinomycètes (WILLIAMS *et al.*, 1989).

Tableau IV : Différentes valeurs de G+C% rencontrées dans le groupe des Actinomycètes (WILLIAMS *et al.*, 1989).

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

4. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants, et en particulier le sol (WAKSMAN, 1959 ; PORTER, 1971; LACEY, 1973; WILLIAMS et *al.*, 1984). Dans le sol, de nombreuses actinomycètes sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les actinomycètes du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur.

Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (LE MINOR, 1989).

Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. D'après LECHEVALIER et LECHEVALIER (1967), les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols.

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

Genre	Habitats
<i>Actinomadura</i>	Sol.
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière végétale.
<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 végétale.
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition.
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière végétale.
<i>Streptosporangium</i>	Sol.
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition.

Tableau VI : Répartition des actinomycètes dans la nature (GRIGOROVA et NORRIS, 1990).

Genre	Habitat
<i>Actinoplanes</i>	Eau douce, litière végétale, sol.
<i>Frankia</i>	Nodule de racines.
<i>Micromonospora</i>	Eau douce, sédiments, sols humides.
<i>Nocardia amarae</i>	Boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Déjections animales, eau, sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	Sol, litière végétale, eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	Compost.

Tableau VII : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 souches issus de 16 sols différents (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1967).

Genre	Pourcentage
<i>Streptomyces</i>	94,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,4
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

La plupart des actinomycètes sont mésophiles, avec une croissance maximale à une température variant de 25 à 30°C. En grande majorité neutrophiles, leur croissance est comprise entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité. Comme la plupart des sols sont acides, le pH constitue évidemment un facteur important influençant leur distribution et leur activité. Cependant, il existe quelques actinomycètes acidophiles appartenant au genre *Streptomyces* pouvant croître à des pH compris entre 3,5 et 6,5 ; en effet elles ont la particularité de produire des hydrolases et des chitinases exerçant leur activité maximale à des pH acides (ALEXANDER, 1977).

5. Intérêt biotechnologique des actinomycètes

Les actinomycètes constituent un groupe fort utile dans le domaine des biotechnologies. Leur hétérogénéité biochimique, 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. Ces produits sont très variés : antibiotiques (voir Tableau VIII), antifongiques (amphotéricine B, nystatine), antiviraux (Panosialine) antitumoraux (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine), insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinotricine), miticide (tétranactine), antihelminthiques (avermectines), et de substances ayant des activités immunosuppressives et immunostimulantes (la rapamycine et le FK500) (CHUN *et al.*, 1997 ; SANGLIER et TRUJILLO, 1997 ; MOORE *et al.*, 1999 ; PETROSYAN *et al.*, 2003 ; CARLE *et al.*, 2003 ; AOYAGI *et al.*, 2006).

La majorité des antibiotiques d'origine naturelle proviennent des actinomycètes (**Figure 7**). Les antibiotiques élaborés sont de structure chimique très variée et 40% d'entre eux sont actifs contre les champignons. Près de 70% de ces molécules actives d'origine actinomycétale sont synthétisées par le genre *Streptomyces* (**Figure 8**), celui-ci étant le plus répandu dans l'environnement (ECKWALL et SCHOTTEL, 1997 ; SANGLIER et TRUJILLO, 1997).

Tableau VIII : Bioactivité des métabolites isolés à partir d'actinomycètes entre 1990 et 1994 (SANGLIER et TRUJILLO, 1997).

Métabolites bioactives	<i>Streptomyces</i> et genres apparentés	<i>Actinoplanaceae</i>	<i>Maduromycetes</i>	<i>Nocardioformes</i>	Autres genres
Anti-Gram positifs	225	18	41	44	19
Anti-Gram négatifs	83	2	11	21	9
Antifongiques	78	1	30	2	6
Anti-levures	69	1	25	2	6
Antiparasitaires	30	-	8	-	4
Herbicides	23	-	2	-	3
Insecticides	28	-	-	10	-
Antiviraux	35	-	8	20	4
Anticancéreux	179	11	10	5	8
Inhibiteurs d'enzymes	126	1	15	3	2
Agents pharmacologiques	160	2	10	7	4
Autres	48	6	4	3	5
Total	1103	42	164	118	70

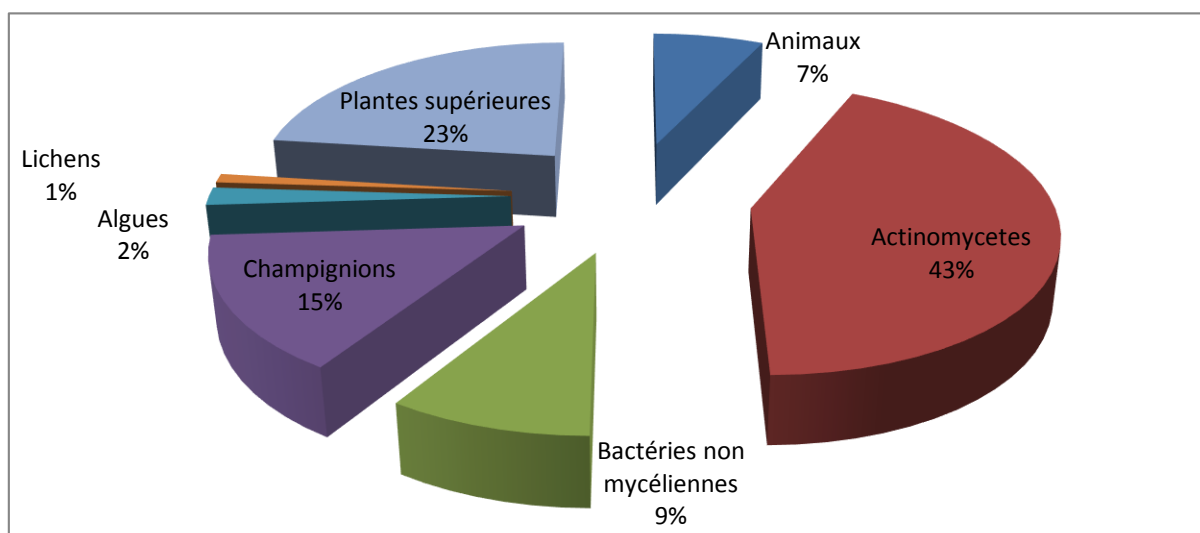


Figure 7 : Pourcentage d'organismes vivants producteurs d'antibiotiques (BERDY *et al.*, 1987).

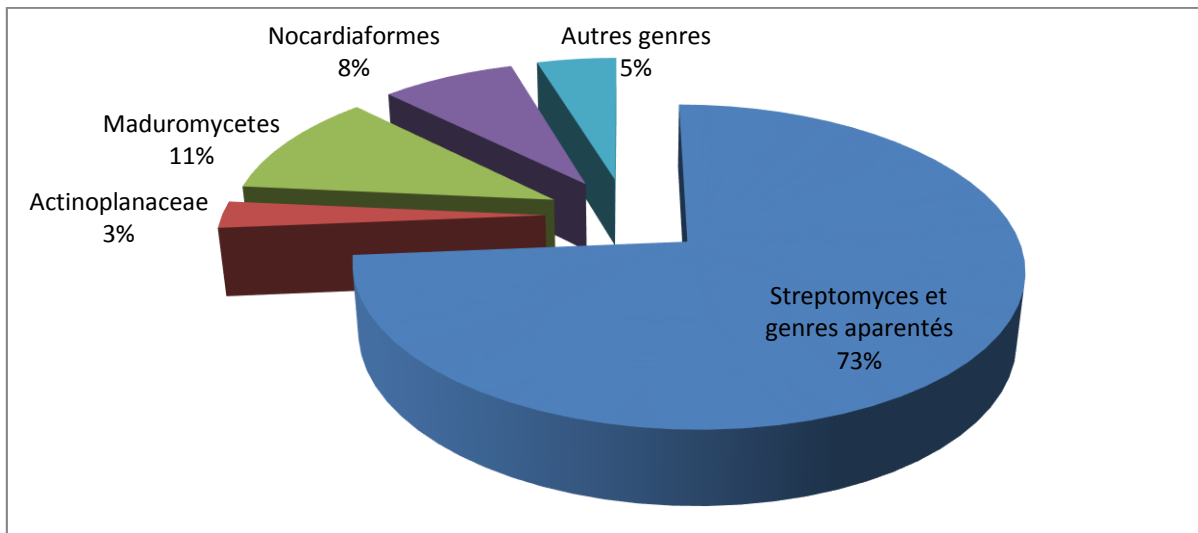


Figure 8 : Répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et genres apparentés et d'autres genres d'actinomycétales (SANGLIER et TRUJILLO, 1997).

Les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes après les antibiotiques, (LOPES *et al.*, 1999), celles-ci sont utilisées dans des domaines très divers, notamment dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose), pharmaceutique (neuraminidases, estérases et oxydases des stérols), en biologie moléculaire (endonucléases de restriction) ; on les retrouve également dans la composition de certains détergents (protéases) (BRESSOLIER *et al.*, 1999 ; HU et OCHI, 2001 ; MITSUIKI *et al.*, 2002). Cependant, si les actinomycètes sont une source appréciable d'enzymes, inversement, ils sont aussi une mine d'inhibiteurs d'enzymes de bas poids moléculaire, car en effet, beaucoup d'actinomycètes producteurs d'antibiotiques élaborent non seulement les enzymes nécessaires à leur formation mais aussi des enzymes inactivant les antibiotiques pour se protéger de leur action toxique.

De nombreux rôles d'importance majeure leurs sont également attribués dans le domaine de l'agriculture, dont la fertilisation des sols (MARIAT et SEBALD, 1990), la fixation de l'azote atmosphérique au niveau des nodules des plantes non légumineuses (ENSIGN *et al.*, 1993 ; HAANSUU, 2002), la décomposition de la matière organique, tels que la ligno-cellulose, l'amidon, la chitine et autres polymères récalcitrants présents dans le sol (WILLIAMS *et al.*, 1984 ; LECHEVALIER, 1988 ; ZIMMERMAN, 1990 ; SRINIVASAN *et al.*, 1991). Ils sont également capables de décomposer les déchets urbains à haute teneur en produits chimiques (GOODFELLOW *et al.*, 1984), à titre d'exemple, certains genres comme *Nocardia*, *Rhodococcus*, *Arthrobacter*, *Mycobacterium* et *Corynebacterium* se

révèlent être d'une grande importance dans la dégradation des hydrocarbures, souvent à l'origine de pollution graves (LACEY, 1988). Enfin certaines souches sont employées en agriculture comme agents biologique de lutte contre certains agents phytopathogènes d'origine tellurique, insectes nuisibles et mauvaises herbes (GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983 ; LECHEVALIER, 1989 ; LYNCH et CROOL, 1992 ; CRAWFORD *et al.*, 1993 ; EL-TARABILY *et al.*, 2000 ; GETHA *et al.*, 2005 ; OMURA *et al.*, 2006).

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

Actinomycètes producteurs	Antibactériens	Références
<i>Streptomyces alboniger</i>	Puromycine	TRAUT et MONRO, 1964
<i>Streptomyces ambofaciens</i>	Spiramycine	AHMED <i>et al.</i> , 1968
<i>Streptomyces mediterraneii</i>	Rifamycine B	WEHRLI, 1968
<i>Streptomyces aureofaciens</i>	Tétracycline	TANAKA <i>et al.</i> , 1972
<i>Streptomyces venezuelae</i>	Chloramphénicol	MALIK, 1972
<i>Streptomyces clavuligerus</i>	Acide clavulanique	READING et COLE, 1977
<i>Streptomyces toyocaensis</i>	A47934	BOECK et MERTZ, 1986
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostomycine	TAKAHASHI <i>et al.</i> , 2003
<i>Streptomyces griseus</i>	Streptomycine	JANA et DEB, 2006
<i>Streptomyces fradiae</i>	Néomycine	JANA et DEB, 2006
<i>Streptomyces spectabilis</i>	Spectinomycine	JANA et DEB, 2006
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigne	LIU <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces lindensis</i>	Rétamycine	INOUE <i>et al.</i> , 2007
<i>Streptomyces griseus</i>	Candididine	JINENEZ <i>et al.</i> , 2009
<i>Streptomyces antibioticus</i>	Simocyclinone D8	OPPEGARD <i>et al.</i> , 2009
<i>Micromonospora rosaria</i>	Rosamicine	ANZAI <i>et al.</i> , 2010
<i>Streptomyces paravulus</i>	Actinomycine D	AJIJUR <i>et al.</i> , 2010
<i>Salinispora arenicola</i>	Arenimycine	ASOLKAR <i>et al.</i> , 2010
<i>Verrucosispora gifhornensis</i>	Gifhornenolones A et B	SHIRAI <i>et al.</i> , 2010
<i>Verrucosispora maris</i>	Abyssomycine	GOODFELLOW <i>et al.</i> , 2012
<i>Nonomuraea spiralis</i>	Pyralomicine	FLATT <i>et al.</i> , 2013
<i>Streptomyces lushanensis</i>	ND	ZHANG <i>et al.</i> , 2014

ND : Non défini.

II. Antibiothérapie et bactério-résistance

1. Notions générales sur les antibiotiques

Par opposition au phénomène de symbiose, le mot antibiotique dérivé du terme « antibiose » crée en 1889 par VUILLEMIN pour distinguer les phénomènes d'antagonisme entre les microorganismes vivants. En 1942, WAKSMAN définit les antibiotiques comme « des substances chimiques naturelles produites par des micro-organismes qui ont le pouvoir d'inhiber d'autres micro-organismes ».

Le mot antibiotique est aujourd'hui employé dans un sens plus large incluant, en outre, toute substance synthétique ou semi-synthétique dotée de ces propriétés (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.*, 1995 ; MOUTON *et al.*, 2000).

Les antibiotiques sont définis par leur :

- activité antibactérienne (certains antibiotiques agissent contre les champignons unicellulaires, et sont donc appelés antibiotiques antifongiques) ;
- bonne absorption et diffusion dans l'organisme ;
- activité en milieu organique ; dans le sang ou les tissus ;
- toxicité sélective grâce à un mécanisme d'action spécifique (YALA *et al.*, 2001), excluant ainsi de cette définition les antiseptiques et les désinfectants, ceux-là étant trop toxiques pour être administrés par voie générale.

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

L'histoire des antibiotiques tels que nous les connaissons actuellement a débuté durant la seconde guerre mondiale, avec la découverte de la pénicilline quelques années plus tôt (FLEMING, 1929). Pendant une dizaine d'années, la pénicilline ne va servir qu'à isoler en laboratoire la bactérie *B. influenzae*, qui seule résiste à son action, son usage à des fins thérapeutiques n'a pu être envisagé qu'à partir de 1940 suite aux travaux de CHAIN et de ses collaborateurs. Les laboratoires de recherche industriels et académiques ont dès lors engagé un processus à grande échelle pour découvrir de nouveaux principes actifs afin d'apporter une réponse thérapeutique aux diverses infections bactériennes connues. Au cours des décennies suivantes, les recherches entreprises ont permis de compléter l'arsenal antibactérien mis à la disposition des médecins et du grand public.

L'âge d'or dans la découverte des antibiotiques a été la période des années 1940-1960 sous l'impulsion de WAKSMAN. Avec ses étudiants et collègues, WAKSMAN a isolé de nombreux antibiotiques sécrétés par des actinomycètes : actinomycine (1940), clavacine, streptothricine (1942), streptomycine (1943), griséine (1946), néomycine (1948), fradicine, candidine, etc. La streptomycine et la néomycine, antibiotiques à plus ou moins large spectres, ont été abondamment utilisées pour le traitement d'infections à l'origine de problèmes de santé publique majeurs à l'époque, notamment contre la tuberculose (causée par l'agent *Mycobacterium tuberculosis*), des méningites et infections respiratoires aiguës (notamment celles causées par l'agent *Haemophilus influenzae*) ainsi que des dermatoses et infections postopératoires de sévérité variable en fonction de l'agent causal. Le genre *Streptomyces* s'est révélé dès lors, et à ce jour, un producteur sans nul autre pareil de molécules antibiotiques.

Aujourd'hui, les traitements antibactériens à base d'antibiotiques, appelés «antibiothérapies», sont très largement prescrits. En 1997, le marché global des antibiotiques ne représentait dès lors qu'un chiffre d'affaire de 20 milliards de dollars (CARBON et BAX, 1998), dix ans plus tard ce chiffre a été multiplié par deux pour atteindre 42 milliards de dollars en 2009, ce qui représente 46% des ventes de médicaments anti-infectieux (qui comprennent également les médicaments antiviraux et vaccins) et 5% du marché pharmaceutique mondial (HAMAD, 2010). En provoquant une importante diminution du taux de mortalité, la découverte des antibiotiques a profondément bouleversé la médecine moderne.

Malgré la révolution apportée par les antibiotiques dans le domaine de la médecine et la découverte de milliers de composés, les maladies infectieuses restent un problème de santé

publique majeure. Ceci s'explique notamment par l'apparition de souches multirésistantes à ces molécules (VAN DER WAAIJ et NORD, 2000). Ainsi, la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques est toujours un enjeu sociétal très important.

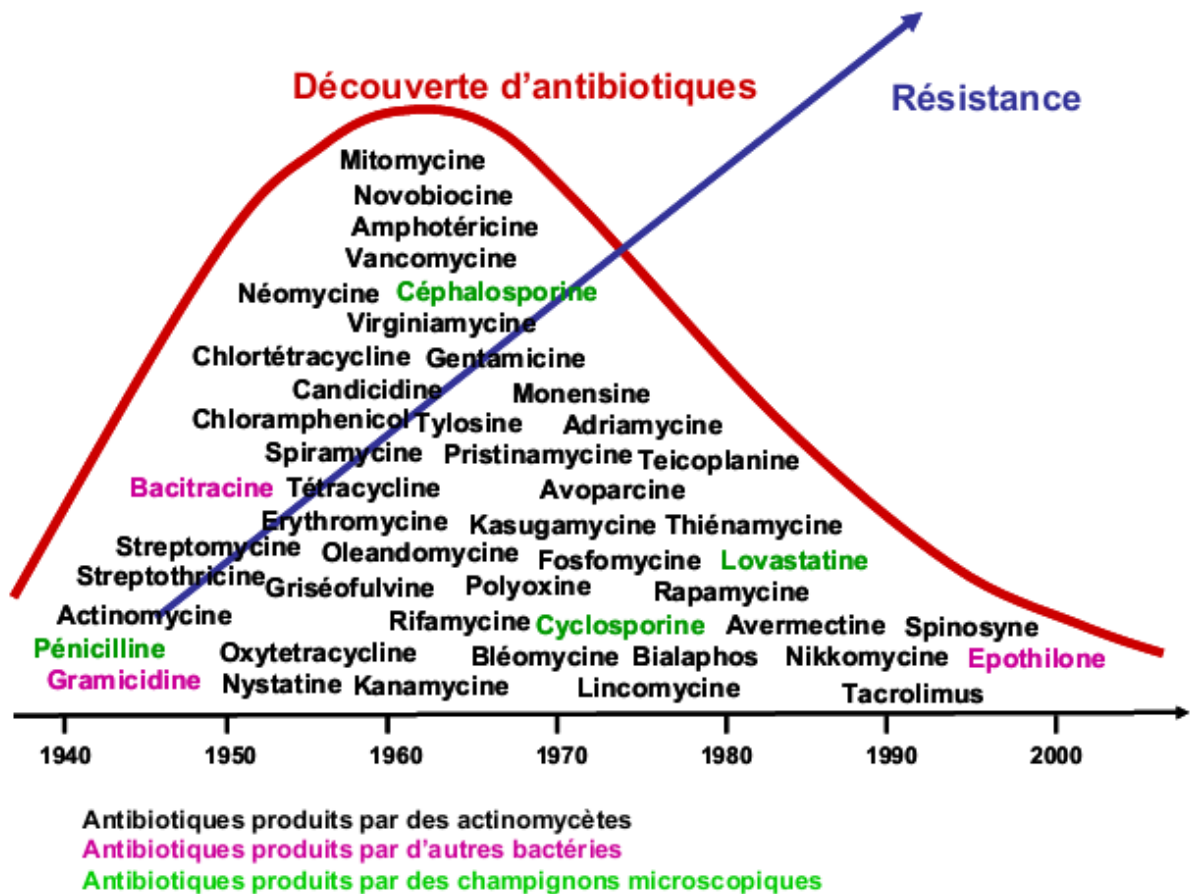


Figure 9 : L'âge d'or de la découverte des antibiotiques d'après HOPWOOD (2007).

2. Notions sur la résistance bactérienne

2.1. Définition

Un micro-organisme est considéré résistant lorsque la concentration minimale inhibitrice (CMI) habituelle d'une substance antibiotique servant à inhiber celui-ci devient insuffisante, et par conséquent, nécessite des concentrations plus élevée comparativement à celle qui inhibe habituellement le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (JONES, 2001).

Cependant, cette définition bactériologique à elle seule ne suffit pas à décrire le phénomène de résistance chez les bactéries ; pour ce faire, celle-ci doit donc être complétée par deux autres : une définition clinique et une autre génétique.

La définition clinique associe la notion de succès et d'échec clinique. Une bactérie résistante peut donc être définie comme étant une bactérie qui échappe au traitement, ce qui peut se manifester par un échec clinique.

La définition génétique, quant à elle, correspond à la présence de gènes de résistance au sein de la bactérie, ces derniers pouvant être décelés par le biais de techniques biophysiques et/ou génétiques.

Une résistance vis-à-vis d'un antibiotique donné peut parfois conférer une résistance vis-à-vis d'un autre antibiotique, c'est ce que l'on appelle la résistance croisée. Les bactéries sont dites « multi-résistantes » lorsqu'à la suite d'accumulation de résistances naturelles et acquises, restreignant ainsi leur spectre de sensibilité à un petit nombre d'antibiotiques. Celles-ci deviennent alors résistantes à plusieurs antibiotiques ou classes pharmacologiques d'antibiotiques (AHMAD, 1999).

2.2. 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 (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra-chromosomique). La résistance peut être naturelle ou acquise (CARLE 2009).

2.2.1. Résistance naturelle

Les gènes de résistance font partie du patrimoine génétique de la bactérie. La résistance naturelle est un caractère présent chez les souches appartenant à la même espèce. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées sur l'antibiotique afin de déterminer son activité et contribuer à définir son spectre antibactérien. A titre d'exemple, la résistance des entérobactéries et du genre *Pseudomonas* aux macrolides, ou encore la résistance des bactéries Gram négatif à la vancomycine sont considérés comme étant naturelles. La résistance bactérienne naturelle est généralement permanente et d'origine chromosomique, celle-ci est donc relativement stable et transmise à la descendance lors de la division cellulaire

(transmission verticale), mais elle n'est généralement pas transférable d'une bactérie à l'autre (transmission horizontale) (YAMASHITA *et al.*, 2000). La résistance naturelle constitue également un critère d'identification (LAVIGNE, 2007).

2.2.2. Résistance acquise

Les bactéries peuvent développer de la résistance contre un antibiotique auquel elles étaient auparavant sensibles, ce qui implique bien évidemment des changements génétiques. Cette résistance est souvent instable en l'absence de facteurs de sélection impliquant la mise à profit de cette faculté dans la survie des bactéries l'ayant développée. Ce phénomène de résistance peut être soit d'origine endogène, résultant d'une mutation spontanée, soit d'origine exogène via l'acquisition de matériel génétique venant d'un autre micro-organisme (PATRICK, 2003).

a. Mutation chromosomique spontanée

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20% des bactéries. Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte généralement qu'un caractère à la fois et la résistance ne concerne qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action (TENOVER 2006). Ce type de résistance ne se transmet que de façon verticale (d'une bactérie à sa descendance).

b. Acquisition de gènes de résistance

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 à Gram positif qu'à Gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles tels que les plasmides. Contrairement aux mutations chromosomiques, les gènes de résistance plasmatiques peuvent non seulement être transmis verticalement, mais aussi horizontalement (d'une bactérie à l'autre) qu'elle soit ou non de la même espèce (CARLE, 2009).

2.3. Origine des gènes de résistance

Après avoir élucidé les mécanismes de transmission de résistances, les biologistes se sont demandé d'où provenaient les gènes de résistance. La survenue de mutations ponctuelles est un phénomène constant, spontané et aléatoire. En revanche, la formation d'un gène de résistance complet et fonctionnel est le fruit d'une longue évolution. De tels gènes ont progressivement fait leur apparition lors des 50 dernières années, c'est-à-dire depuis le début de l'utilisation thérapeutique des antibiotiques.

En 1970, des biologistes émirent l'hypothèse que les gènes de résistance existent d'ores et déjà au niveau micro-organismes produisant spontanément des molécules aux propriétés antibiotiques dans les systèmes naturels. En effet, sans cette protection conférée par les gènes de résistance, ces microorganismes producteurs de molécules antibiotiques s'autodétruiraient. Cette hypothèse a d'abord été vérifiée chez une espèce du genre *Streptomyces* produisant en plus d'un antibiotique de la famille des aminosides, des enzymes analogues à celles qui confèrent aux bactéries pathogènes la résistance à cet antibiotique. (ANDREMONT *et al.*, 1997). Toujours dans les sens de cette hypothèse, il a par la suite été constaté qu'une souche d'*Escherichia coli* lyophilisée en 1946 contenait un plasmide portant des gènes de résistance à la streptomycine (1943) et à la tétracycline (1972), bien que ces deux antibiotiques aient été employés médicalement plusieurs années après sa conservation. De plus, il a été montré que des souches portant sur leur plasmide des gènes pour la résistance à la pénicilline semi-synthétique existaient bien avant que celle-ci n'ait été synthétisée (MADIGAN et MARTINKO, 2007). Les antibiotiques n'ont donc pas créé de nouveaux gènes ni de nouvelles bactéries, mais seulement favorisé la sélection et la dissémination des bactéries possédant déjà des gènes de résistance.

2.4. Mécanismes de résistance

Les bactéries ont su développer des mécanismes divers et variés afin d'inhiber l'action des antibiotiques utilisés en thérapeutique.

2.4.1. La 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).

2.4.2. La 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).

2.4.3. La surexpression de la cible de l'antibiotique

En produisant davantage de 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).

2.4.4. La 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).

2.4.5. La réduction de la perméabilité membranaire

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

2.4.6. Résistance par efflux

Les bactéries sont capables d'éliminer les antibiotiques par transport actif hors de la cellule. Ce mécanisme a 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).

2.4.7. Défense altruiste

Des bactéries très résistantes sont capables de synthétiser l'indole en très grande quantité pour subvenir aux besoins des bactéries sensibles. Ce composé organique possède une double fonction de résistance : efflux des antibiotiques et activation d'une voie métabolique empêchant la synthèse de radicaux libres qui peut être favorisée par l'antibiotique.

3. Epidémiologie de la résistance aux antibactériens

L'efficacité remarquable des antibiotiques s'est accompagnée de leur utilisation massive et répétée en santé humaine et animale. Ce phénomène a généré une pression sur les bactéries, qui ont développé des systèmes de défense contre ces antibiotiques. On parle de pression de sélection, conduisant à l'apparition de résistances. La mauvaise utilisation des antibiotiques, passant par des traitements trop courts ou trop longs, parfois mal dosés, est également pointée du doigt.

Ponctuelles au départ, ces résistances sont devenues massives et préoccupantes. Certaines souches sont multirésistantes, c'est-à-dire résistantes à plusieurs antibiotiques. D'autres sont même devenues toto-résistantes, c'est-à-dire résistantes à tous les antibiotiques disponibles. Ce dernier cas est heureusement encore rare, mais le phénomène est en augmentation. Il place les médecins dans une impasse thérapeutique : dans ce type de situation, ils ne disposent plus d'aucune solution pour lutter contre l'infection.

Certaines résistances posent plus spécifiquement problème en milieu hospitalier. C'est par exemple le cas pour les souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méticilline (SARM), responsables d'infections diverses, pulmonaires et osseuses, ainsi que de septicémies, en particulier dans les unités plus sensibles (soins intensifs). Par ailleurs, la vancomycine était l'antibiotique de choix pour le traitement des infections causées par le SARM, jusqu'à l'apparition des premières souches résistantes (SARV) (HIRAMATSU *et al.*, 1997).

Pseudomonas aeruginosa, responsable de nombreuses infections nosocomiales, présente plus de 20 % de résistance aux carbapénèmes. Certaines souches toto-résistantes sont notamment retrouvées chez les patients atteints de mucoviscidose.

Acinetobacter baumannii est également redoutée en milieu hospitalier. La part des infections nosocomiales liées à cette bactérie résistante à l'imipénème est passée de 2 ou 3 % en 2008 à 11,1 % en 2011. Le phénomène est d'autant plus préoccupant que la persistance de cette bactérie dans l'environnement est impressionnante et qu'elle se développe préférentiellement chez des malades immunodéprimés et vulnérables.

En dehors des hôpitaux, on rencontre d'autres problèmes comme celui du pneumocoque résistant à la pénicilline, retrouvé dans de nombreuses infections ORL. Cette résistance, quasiment nulle il y a vingt ans, a atteint un pic à 48 % en 2002. Aujourd'hui, elle concerne 27 % des souches.

Le cas le plus préoccupant, en milieu urbain comme en milieu hospitalier, est celui des entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre étendu (EBLSE). Leur fréquence est en augmentation constante depuis dix ans dans certaines espèces comme *Escherichia coli* ou *Klebsiella pneumoniae* qui sont devenues résistantes aux céphalosporines de troisième génération. A titre d'exemple, *Escherichia coli* responsable de nombreuses infections urinaires, est devenue très tôt résistante à l'amoxicilline. Cet antibiotique qui n'est donc plus utilisé en première intention, a été remplacé par les céphalosporines de 2ème puis de 3ème génération. Aujourd'hui, en milieu urbain, 7 % des souches y sont devenues résistantes. Les médecins doivent alors utiliser des antibiotiques « de réserve » : les carbapénèmes. Mais là encore, l'utilisation massive de ces derniers peut entraîner l'apparition de souches résistantes, plaçant les médecins en situation d'impasse thérapeutique.

Ces phénomènes de résistance surviennent dans tous les pays du monde et sont particulièrement importants dans les pays où les niveaux d'hygiène sont faibles. Il existe un véritable gradient nord-sud, avec des taux plus faibles dans les pays du Nord. La proportion de SARM varie par exemple de moins de 1 % en Norvège et Suède, à plus de 25 % dans le sud de l'Europe (Espagne, Italie, Grèce, Portugal...). Ces différences résultent notamment de stratégies de prévention de la transmission et de l'importation de bactéries résistantes, ainsi que de stratégies de maîtrise de la consommation d'antibiotiques plus ou moins précoces et strictes (INSERM, 2013).

Le rapport 2014 de l'OMS sur la surveillance mondiale de la résistance aux antimicrobiens (premier du genre) dresse un tableau assez complet de la résistance actuelle aux antibiotiques, avec des données provenant de 114 pays. Ce rapport révèle en substance que la résistance aux antibiotiques n'est plus un souci pour l'avenir, mais une réalité devenue palpable partout dans le monde. Faute d'une action concertée d'urgence, le monde se dirige vers une ère post-antibiotiques, dans laquelle des infections courantes et des blessures sans gravité qui ont pu être traitées pendant des décennies pourront recommencer à tuer.

Les résultats de ce rapport sont en effet très préoccupants et témoignant de la résistance aux antibiotiques, en particulier aux antibiotiques dits «de dernier recours», dans toutes les régions du monde.

- Région africaine

Le rapport fait état de lacunes majeures dans le suivi de la résistance aux antibiotiques dans la région africaine de l'OMS, des données n'étant rassemblées que dans un nombre limité de pays. Une résistance importante est constatée pour plusieurs bactéries qui se sont propagées dans les hôpitaux et les communautés. Il s'agit notamment de la forte résistance d'*Escherichia coli* aux céphalosporines et fluoroquinolones de troisième génération. Dans certaines parties de la région, jusqu'à 80% des infections à *Staphylococcus aureus* se sont avérées résistantes à la méticilline (SARM).

- Région des Amériques

L'Organisation panaméricaine de la Santé, Bureau régional OMS des Amériques, coordonne la collecte de données sur la résistance aux antibiotiques auprès des hôpitaux et des laboratoires dans 21 pays de la région. Les résultats montrent des niveaux élevés de résistance d'*Escherichia coli* aux céphalosporines et aux fluoroquinolones de troisième génération. La résistance aux céphalosporines de troisième génération de *Klebsiella pneumoniae* est également importante et largement répandue. Dans certains lieux, les infections à SARM atteignent 90% des cas.

- Région de la Méditerranée orientale

Les données présentées dans le rapport témoignent d'une résistance aux antimicrobiens largement répandue dans l'ensemble de la région OMS de la Méditerranée orientale. En

particulier, les niveaux élevés de résistance d'*Escherichia coli* aux céphalosporines et aux fluoroquinolones de troisième génération y ont été décelés. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de troisième génération est également importante et largement répandue. Dans certaines parties de la région, plus de la moitié des infections des infections à *Staphylococcus aureus* se sont avérées résistantes à la méticilline. Le rapport révèle d'importantes lacunes dans le suivi de la résistance aux antibiotiques dans la région.

- Région européenne

Le rapport révèle que des niveaux élevés de résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de troisième génération ont été constatés dans l'ensemble de la région européenne de l'OMS. Dans certains lieux, jusqu'à 60% des infections à *Staphylococcus aureus* se sont avérées résistantes à la méticilline

- Région de l'Asie du Sud-Est

Les données disponibles révèlent que la résistance aux antibiotiques est un problème en rapide expansion dans la Région OMS de l'Asie du Sud-Est, qui abrite un quart de la population mondiale. Les résultats du rapport indiquent des niveaux élevés de résistance d'*Escherichia coli* aux céphalosporines et aux fluoroquinolones de troisième génération dans la région. La résistance aux céphalosporines de troisième génération de *Klebsiella pneumoniae* est également importante et largement répandue. Dans certaines parties de la Région, plus d'un quart des infections à staphylocoque doré seraient résistantes à la méticilline.

- Région du Pacifique occidental

Le rapport fait état de niveaux élevés de résistance d'*Escherichia coli* aux fluoroquinolones. La résistance de *Klebsiella pneumoniae* aux céphalosporines de troisième génération est également courante. Dans certaines parties de la Région, jusqu'à 80% des infections à *Staphylococcus aureus* se sont avérées résistantes à la méticilline.

Matériel et Méthodes

I. Echantillonnage

1. Choix du type d'échantillon

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants. Dans un contexte où nous disposons de moyens et de temps limités afin de mener à bien notre étude, un choix s'impose donc naturellement quant à la nature de l'échantillon à prélever (eau, sol, écorce, litière végétale, etc.). En effet cet échantillon doit non seulement potentiellement contenir des actinomycètes en très grand nombre mais doit aussi être le plus représentatif possible de ce groupe (diversité), ceci afin de multiplier nos chances de trouver des souches potentiellement productrices de molécules antimicrobiennes.

La littérature rapporte de nombreux travaux sur l'isolement de ces micro-organismes à partir d'échantillons prélevés de sols appartenant à des niches écologiques très diverses. Ils ont débuté sérieusement avec les travaux de WAKSMAN en 1959 et ne cessent d'être poursuivis à ce jour (GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983 ; WELLINGTON *et al.*, 1987 ; GRIGOROVA et NORRIS, 1990 ; SANGLIER *et al.*, 1993 ; WADEWAR et PATIL, 2013 ; AOUCHE *et al.*, 2014) ; d'autres travaux faisant état de la répartition de différents genres d'actinomycètes dans la nature (voir Tableaux V et VI) semblent clairement indiquer que le sol est l'habitat où l'on y trouve la plus grande diversité. Le prélèvement d'échantillons de sol semble donc plus adéquat comparativement à des échantillons d'eau, de litière végétale, d'écorce ou autres.

2. Choix du site d'échantillonnage

Toujours dans un souci d'assurer une représentativité optimale, et afin d'accroître nos chances d'isoler des souches potentiellement productrices de nouvelles molécules bioactives aux propriétés antimicrobiennes, nous avons orienté notre choix sur un écosystème cible sur lequel nous allons effectuer notre échantillonnage en fonction des critères suivants :

- un écosystème jusque-là inexploré du point de vue microbiologique ;
- un écosystème faiblement pollué (loin de l'activité humaine), afin de permettre l'isolement de souches éventuellement sensibles à certains polluants (tels que les hydrocarbures, les métaux lourds, certains produits d'entretien, et autres) ;
- un écosystème couvrant plusieurs habitats contigus (milieu terrestre, hydrique, litière végétale, rhizosphères) afin de profiter de l'effet lisière.

Dans cette optique, nous avons décidé que notre échantillonnage allait toucher les abords d'une source et ses alentours. La source choisie, connue sous le nom de « Amezyav Ath Yaou », elle-même faisant partie d'un vaste réseau de sources dans la région connu sous le nom de « Lemzayev », se situe en contrebas de la localité d'Ighil Bougueni (commune d'Ain El Hammam, wilaya de Tizi-Ouzou) à la périphérie d'un territoire forestier, zone également réputée pour sa très forte inclinaison et sa difficulté d'accès.

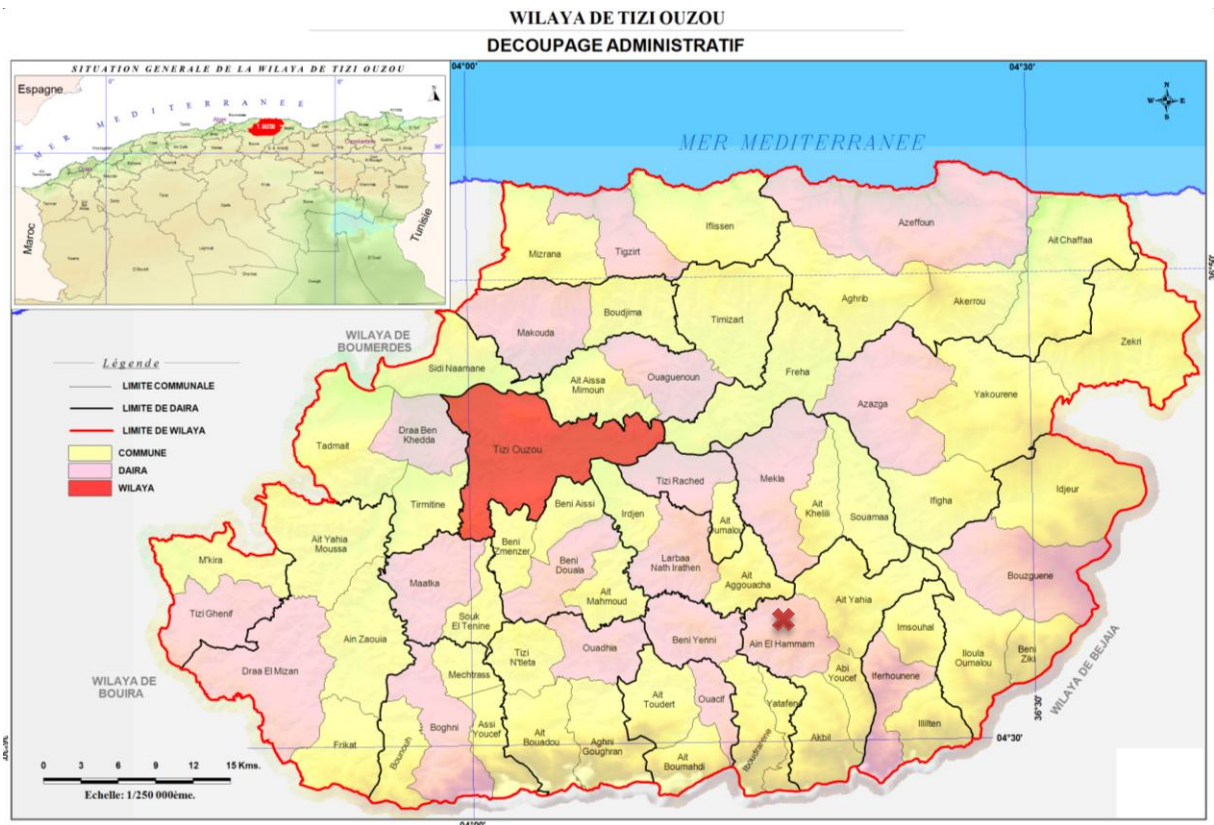


Figure 10 : Localisation géographique de la zone d'échantillonnage (représentée par une croix) (Source : Annuaire statistique de la wilaya de Tizi-Ouzou, 2012).

En tout, 10 échantillons ont été prélevés au niveau de la dite source et de ses alentours durant le mois de mai 2014. Ceux-là ont été prélevés à la fois sur les parois de la source, sur le sillage de l'eau, en amont, en aval ainsi qu'au niveau de la rhizosphère de quelques arbres autour du site.



Figure 11 : Site d'échantillonnage : source Amezyav ath Yaou, Ain El Hammam, Tizi-Ouzou.

3. Méthode de prélèvement

Le prélèvement est effectué selon la technique de POCHON ET TARDIEUX (1962) : à l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés, on prélève alors notre échantillon dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15, voire jusqu'à 30 centimètres de profondeur) tout en écartant les gros débris (pierres, racines, etc.). Les échantillons sont ensuite transportés et stockés dans de grands bacs en plastique hermétiques. L'ensemble des prélèvements ont été par la suite mélangés pour constituer un échantillon homogène.

II. Culture et isolement

L'objectif du présent schéma expérimental est double : nous voulons d'une part isoler des souches d'actinomycétales productrices de molécules bioactives aux propriétés antimicrobiennes, et, d'autre part, par un certain nombre d'itérations (variation de la période de

stockage de l'échantillon, des dilutions ainsi que l'application ou non d'un traitement thermique), tenter de dégager un model expérimental type permettant l'isolement de ces micro-organismes sans avoir recours à l'utilisation de substances inhibitrices.

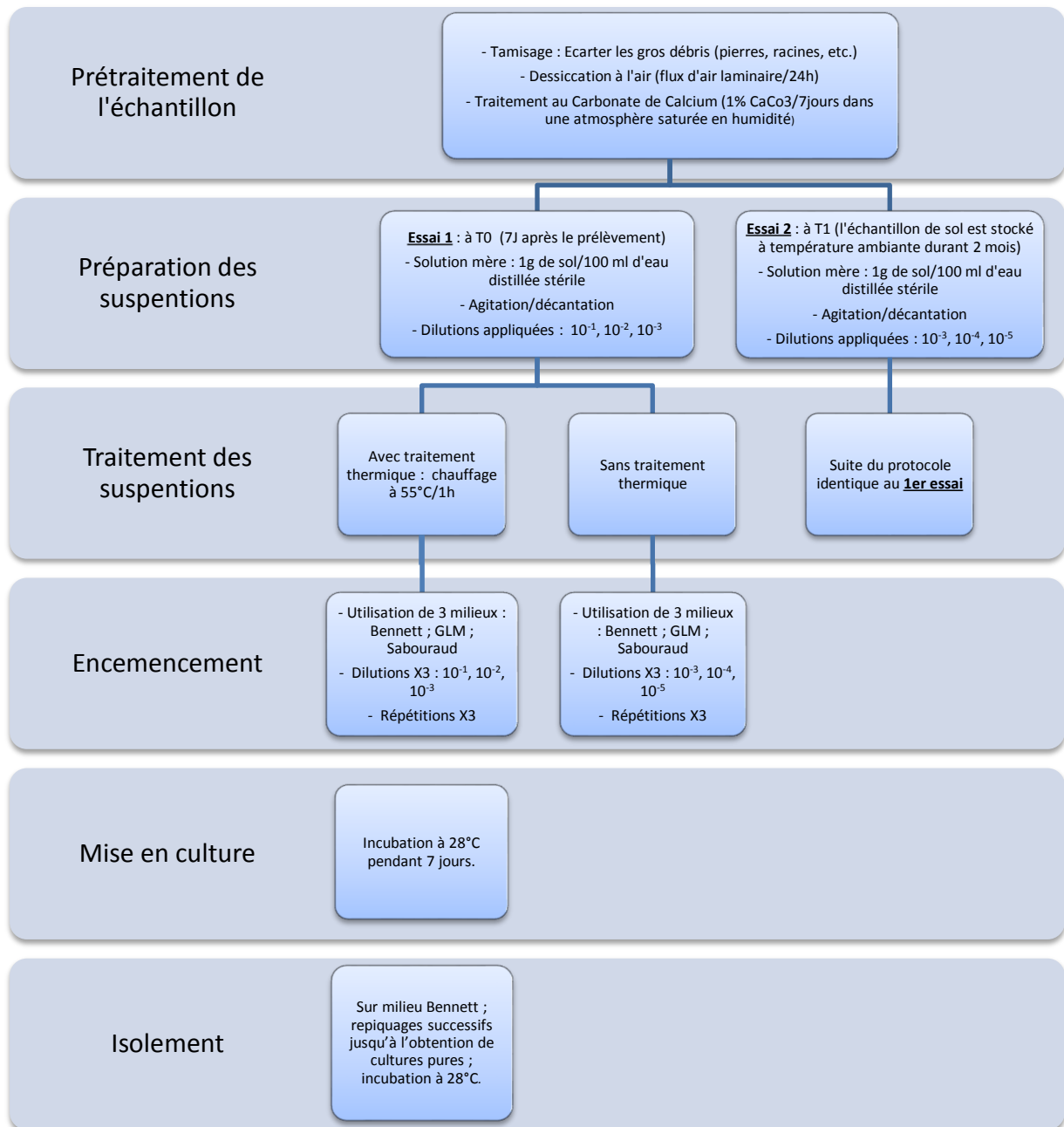


Figure 14 : Synthèse du protocole d'isolement sélectif appliqué.

Le présent travail a été réparti en deux essais d'une part pour adapter le processus expérimental aux capacités du laboratoire (disponibilité des incubateurs, maintiens de conditions minimales d'asepsie lors des manipulations), d'autre part, les travaux d'isolement de spécimens microbiens à partir de niches écologiques variées génèrent habituellement

beaucoup de données brutes, (résultats du dénombrement, morphologie des colonies, physiologie, comportement vis-à-vis des facteurs sélectifs, etc.), une répartition en deux temps faciliterait donc le processus de collecte de ces données. Une telle disposition nous permet également d'apporter, si nécessaire, des modifications au protocole (ce qui a été le cas dans le présent travail) afin de palier à d'éventuels manques dont souffrirait celui-ci.

1. Prétraitement de l'échantillon

L'isolement sélectif des actinomycètes, à partir de leur habitat, pose un certain nombre de problèmes. En effet, trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (WILLIAMS *et al.*, 1982 ; CRAWFORD *et al.*, 1993).

Pour pallier à cette faiblesse, différentes méthodes ont été développées dans le but favoriser la croissance des actinomycétales par rapport aux bactéries et aux champignons et ainsi faciliter leur isolement (SHEARER, 1987). Elles reposent essentiellement sur le traitement des échantillons, le développement de milieux appropriés et l'addition aux milieux d'isolement de substances inhibitrices stoppant la croissance des germes envahisseurs (LARPENT *et al.*, 1989 ; OUHDOUCHE *et al.*, 2001 ; HILALI *et al.*, 2002).

Notre échantillon de sol a donc subi différents types de traitements à différents stades du processus expérimental : séchage à l'air, traitement au carbonate de calcium, traitement thermique, et stockage. Dans une logique de préservation d'éventuelles souches sensibles à certains antibiotiques pouvant représenter un intérêt, nous avons préféré ne pas avoir recours à ces derniers. En effet, l'utilisation d'antibactériens dans le processus d'isolement sélectif des actinomycètes fait l'objet de nombreuses controverses au sein de la communauté scientifique. Selon PORTER et ses collaborateurs (1960), la plupart des antibactériens couramment utilisés en tant que facteur sélectif inhibent beaucoup d'actinomycètes.

1.1. Dessiccation à l'air

Le séchage à l'air élimine la plupart des bactéries selon CAVALLA et EBERLIN, (1994). En effet, il permet d'éliminer les formes végétatives naturellement présentes dans l'échantillon tout en activant la sporulation, permettant ainsi de réduire drastiquement la charge microbienne de l'échantillon, ne laissant ainsi que les microorganismes capables de libérer des spores, dont

les actinomycètes. De ce fait, environs 100g de notre échantillon de sol a tout d'abord été tamisé (afin d'éliminer pierres, racines et autres débris), puis séché à l'air à l'aide d'un dispositif à flux d'air laminaire dans une enceinte close, pendant 24 h à température ambiante.

1.2. Traitement au carbonate de calcium

Selon ALFEROVA et TEREKHOVA (1988) le traitement au CaCO_3 favorise la sporulation et augmente par conséquent considérablement (jusqu'à 100 fois) le nombre d'actinomycètes dans l'échantillon de façon considérable, ce traitement entraîne également une diminution de la flore fongique.

Trente grammes de notre échantillon de sol préalablement séché à l'air ont été mélangés avec 0,3 g (1%) de CaCO_3 , réparti sur trois boîtes de Pétri puis incubés à 28°C pendant 7 jours dans une atmosphère saturée en humidité. L'atmosphère saturée en humidité est créée à l'aide de papier filtrant humidifié avec quelques millilitres d'eau physiologique stérile posé sur le dessus de la boîte, auquel on ajoutera du coton (préalablement autoclavé), lui aussi humidifié afin de maintenir un taux d'humidité relativement élevé sur toute la durée de l'incubation (EL-NAKEEB et LECHEVALIER, 1963).

1.3. Traitement par le stockage

Ce procédé utilise comme principe la grande résistance des spores des actinomycètes aux variations de température et à la dessiccation. En effet, certaines espèces de *Streptomyces* produisent des spores pouvant survivre plus de 20 ans (HOPWOOD et SERMONTI, 1962), d'autres actinomycètes thermophiles possèdent des endospores réputées pour leur grande résistance aux conditions extrêmes. Le stockage à court terme faciliterait donc l'isolement de ces micro-organismes en réduisant la charge microbienne sensible aux variations de température et d'humidité présente dans notre échantillon.

Dans cette optique, l'échantillon a été stocké durant deux mois à température ambiante avant de procéder au second essai.

1.4. Traitement thermique

Le chauffage des échantillons de sol est l'une des techniques de traitement les plus utilisées. Une température allant de 55°C à 100°C pendant 1 heure, réduit considérablement le nombre de bactéries sans affecter celui des actinomycètes (EL-NAKEEB et LECHEVALIER, 1963). Cependant ce type de traitement ne convient pas à tous les genres d'actinomycètes ; en effet celui-ci est beaucoup plus utilisé pour l'isolement sélectif ciblant certains genres en particulier, d'autres genres tel que *Streptomyces* qui n'y résistent pas (NONOMURA et OHARA, 1969 ; TAKIZAWA *et al.*, 1993).

L'un des deux tubes contenant 50 ml de solution mère a donc subi un traitement thermique à 55°C pendant 1 heure en chaleur humide avant de subir les dilutions décimales propres à chacun des deux essais.

2. Préparation des suspensions

Un gramme de sol traité est dilué dans 100 ml d'eau distillée stérile, la suspension ainsi obtenue est ensuite agitée vigoureusement durant 20 minutes, puis laissée au repos quelques minutes (EL-NAKEEB et LECHEVALIER, 1963). Une partie du surnageant est ensuite transféré dans deux tubes à raison de 50 ml chacun, l'un d'entre eux subira un traitement thermique. La suite du protocole a ensuite été effectuée selon deux variantes concrétisées par deux essais :

Premier essai

Le premier essai a été effectué 7 jours après la collecte de nos échantillons de sol. Des dilutions en série de 10^{-1} à 10^{-3} ont y été effectuées à partir de la solution mère.

Second essai

Les résultats du premier essai étant peu satisfaisants, un second essai a été effectué deux mois plus tard, une partie de l'échantillon de sol préalablement traité au CaCo₃ (1%) a donc été stockée à température ambiante. Des dilutions en séries de 10^{-3} à 10^{-5} y ont été effectuées. Les variations au niveau du protocole réalisées dans cet essai sont censées réduire la charge microbienne de l'échantillon facilitant ainsi l'isolement des actinomycètes.

3. Mise en culture

Trois milieux de culture favorables à la croissance des actinomycètes ont été retenus :

- le milieu Bennett : composé de 10g/l de glucose, 2g/l d'extrait de levure, 2g/l de peptone, 1g/l d'extrait de viande et de 20g/l d'agar, pH = 7,2 ;
- le milieu GLM (gélose à l'extrait de levure et à l'extrait de malt) : composé de 10g/l de glucose, 3g/l d'extrait de levure, 3g/l d'extrait de malte, 5g/l de peptone et de 20g/l d'agar, pH = 7,2 ;
- le milieu Sabouraud (sans chloramphénicol) : composé de 40g/l de glucose, 10g/l de peptone et de 20g/l d'agar, pH = 5,6 ;

Par la suite, 50 microlitres de chacune des dilutions ont été ensemencés par étalement sur les trois milieux à raison de trois répétitions, le tout a été incubé à 28°C pendant 7 jours.

4. Isolement des souches représentatives

Après une période d'incubation de 7 jours, différents phénotypes ont été isolés par repiquages successifs jusqu'à l'obtention d'une souche pure suivant un quota de 20 souches par essai et d'un maximum de deux repiquages successifs par isolat. Les colonies montrant des signes évidents d'activité antimicrobienne (zones d'inhibition, croissance exclusive) ont été sélectionnées en priorité. Une description sommaire des caractères morphologiques et culturels de ces souches a été effectuée.

III. Recherche de l'activité antimicrobienne

1. Choix des microorganismes cible

L'activité antibactérienne des souches précédemment isolées a été testée vis-à-vis de souches bactériennes appartenant à l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit de bactéries à coloration de Gram négative, *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et d'une bactérie à coloration de Gram positive, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Quant à l'activité antifongique, celle-ci a été testée contre *Candida albicans*.

2. Criblage de l'activité antibactérienne

2.1. Criblage primaire par la technique des stries perpendiculaires

Le criblage primaire vise à obtenir des données qualitatives, c'est-à-dire la présence ou l'absence de phénomènes d'inhibition vis-à-vis des microorganismes test. Les isolats sont ensemencés sur le milieu Bennett sous la forme d'une strie longitudinale, les boîtes sont ensuite incubées à 28°C. Après 7 jours d'incubation une épaisse biomasse bactérienne s'est développée au niveau des stries, les bactéries test y sont ensuite ensemencées de façon perpendiculaire. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C. La présence de phénomènes inhibition est constatée après 24 à 48h d'incubation.

2.2. Criblage secondaire par la technique des cylindres d'agar

Le screening secondaire sert à la fois à confirmer les données qualitatives (présence ou absence de phénomène d'inhibition) et à obtenir des données quantitatives concrétisées par l'amplitude des zones d'inhibition autour des cylindres d'agar. Les isolats sont ensemencés en stries serrées sur le milieu de Bennett et incubés à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres de 8 mm de diamètre sont coupés et placés sur le milieu Müller Hinton, préalablement, ensemencé par les bactéries tests. Les boîtes sont laissées à 4°C pendant 4 heures, pour permettre aux métabolites (éventuels) de se diffuser sur le milieu. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après 24 à 48h d'incubation.

3. Criblage de l'activité antifongique

Les souches ayant montré une activité antibactérienne sont ensuite testées contre *Candida albicans* via la méthode des cylindres d'agar. Les isolats sont ensemencés en stries serrées sur milieu de Bennett et incubées à 28°C pendant 7 jours. Des cylindres de 8 mm de diamètre sont coupés et placés sur le milieu Sabouraud, celui-ci préalablement ensemencé de la souche fongique test. Les boîtes sont ensuite incubées à 28°C. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après 7 jours d'incubation.

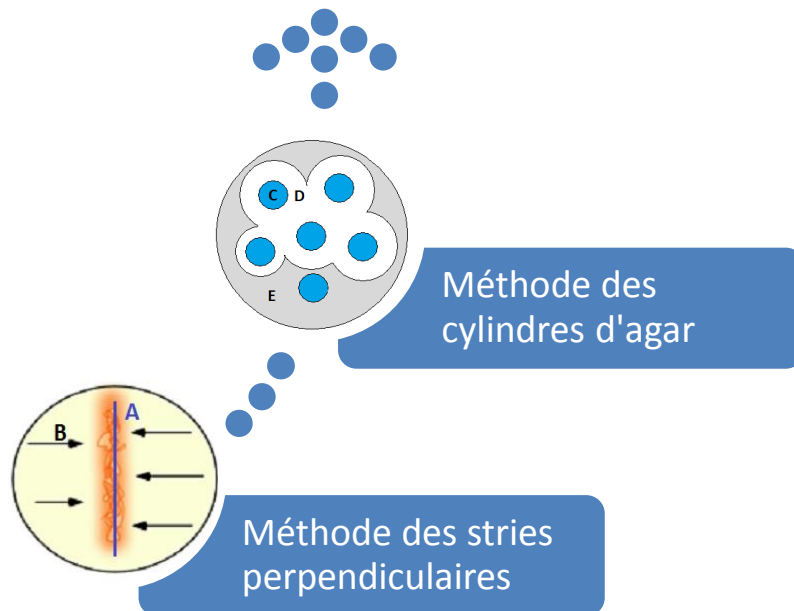


Figure 13 : Protocole de criblage. (A) emplacement de l'isolat disposé sous la forme d'un strie longitudinal (B) emplacement des souches bactérienne test disposés perpendiculairement au strie précédent (C) cylindre d'agar contenant une colonie de l'isolat (D) zone d'inhibition (E) souche bactérienne test (WADEWAR et PATIL, 2013).

IV. Sélection des actinomycétales bioactives et caractérisation partielle des souches représentatives

1. Sélection des actinomycétales parmi les isolats ayant montré une activité antimicrobienne

Les isolats ayant montré une activité antimicrobienne lors du criblage ont été ensuite soumis à une coloration de Gram puis observés au microscope optique au grossissement ($G \times 100$). Les isolats à coloration Gram positive possédant un aspect filamenteux, correspondant ainsi aux propriétés principales des actinomycètes, ont été sélectionnés.

1.1. Préparation des frottis

Sur une lame stérile, déposer une goutte d'eau stérile, puis à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, prélever une colonie provenant de la souche à étudier que l'on diluera dans cette même goutte d'eau stérile, celle-ci est ensuite étalée sur la surface de la lame, séchée et fixée à la flamme du bec Bunsen.

1.2. Coloration de Gram

Les frottis préalablement préparés sont ensuite colorés avec une solution de violet de Gentiane pendant une minute, recouvertes de lugol pendant 45 sec (x2), décolorés à l'alcool à 95°C pendant 30 sec ; l'effet de l'alcool est arrêté par lavage à l'eau du robinet, les frottis sont recolorés à la fuchsine pendant une minute puis rincés abondamment à l'eau du robinet. Une fois séchées, les lames sont observées au microscope optique à l'immersion au grossissement (G x100).

2. Caractérisation morphologique et biochimique des souches sélectionnées

2.1. Critères morphologiques

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

2.2. Critères biochimiques

a. 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 au quel on ajoute un disque ONPG. L'apparition d'une couleur jaune au bout d'une heure indique la présence de la β -galactosidase.

b. Recherche de l'oxydase

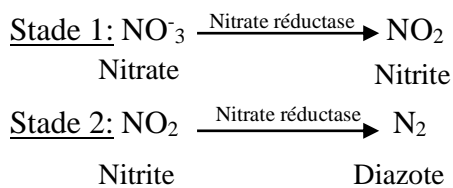
Quelques millilitres de la souche préalablement mise en suspension sont versés dans un tube à essai au quel on ajoute un disque d'oxydase. La réaction est quasi instantanée, si la souche est oxydase positive on devrait constater l'apparition de la couleur violette au bout d'une minute.

c. Recherche de la Catalase

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

d. 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 poursuivie jusqu'au stade diazote (Stade 2) selon le schéma réactionnel suivant :



L'utilisation des nitrates comme accepteurs d'électrons 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 nitrates après incubation de la bactérie sur un milieu nitraté.

Des tubes contenant de bouillon nutritif de nitrates de potassium sont ensemencés, 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 al.*, 1991).

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

En cas de réaction négative : absence de nitrites → 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 (2^{ème} stade). La bactérie possède la Nitrate réductase.

e. Etude de la fermentation des sucres (Glucose, Lactose, Saccharose) et recherche du caractère H₂S à l'aide du milieu d'identification multiple 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. Les résultats se manifestent comme suit :

- les fermentations sucrées se traduisent par une acidification qui fait virer au jaune le rouge de phénol (indicateur pH) ;
- pour faciliter la détection des germes qui fermentent uniquement le glucose, la concentration de ce sucre a été abaissée au 1/10^{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 à 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 le saccharose font virer au jaune la pente du tube ;
- la production de sulfure d'hydrogène se manifeste dans le culot par l'apparition d'une coloration noire de sulfure de fer qui est due à la réduction du thiosulfate en présence de citrate ferrique ;
- la production de gaz (hydrogène, dioxyde de carbone) résultant des fermentations sucrées se traduit ou bien par l'apparition de bulles ou bien par la fragmentation de la gélose.

f. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Le caractère Citrate est recherché sur le milieu Citrate de Simmons. Ce milieu en tube incliné permet de mettre en évidence l'utilisation du citrate comme seule source de carbone et d'énergie.

La pente du milieu de citrate de Simmons estensemencée 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.

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).

g. Caractère mannitol et mobilité

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

- 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 est mise en évidence par l'apparition d'un trouble homogène (capacité des bactéries à envahir l'ensemble de ce milieu faiblement gélosé).

Un tube de milieu Mannitol Mobilité estensemencé avec le germe à étudier par piqûre centrale à l'aide d'une pipette Pasteur stérile, puis incubé à 28°C pendant 7 jours.

h. 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 du 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 CO_2 , 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 2 tubes :

- l'un sera recouvert de vaseline (tube fermé) ;
- l'autre non recouvert (tube ouvert).

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

➤ Après incubation :

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

i. 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 micro-organismes. 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 (acides 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 le butanediol et l'acétoïne par la voie du butylène glycol (fermentation butanediolique). La production d'acétoïne est mise en évidence par l'ajout de soude 1N (VPI) et de α -naphтол (VPII) ce qui provoque un virage du milieu vers la couleur rose.

La souche préalablement mise en suspension est ensemencée 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 2 gouttes de solution de Rouge de Méthyle à 2,5% d'alcool à l'un des deux tubes, la réaction est quasi instantanée ;
- **réaction VP** : ajout de 3 gouttes d' α -naphthol et 3 gouttes de solution de soude. Laisser le tube ouvert et le maintenir en position incliné afin de maximiser la surface du liquide en contact avec l'oxygène. Laisser agir environ 10 minutes.

j. 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 en rouge intense, ce dernier se concentre à la surface du tube formant une sorte d'anneau.

k. Croissance à différentes températures

Afin de déterminer les niveaux de tolérance à des températures d'incubation croissantes et afin de cerner de façon approximative la température optimum de croissance des souches microbiennes sélectionnées, celles-ci ont étéensemencées sur le milieu Bennett puis incubées à 37°C et à 42°C pendant 7 jours.

Résultats et Discussion

Tableau XI : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon ayant subi un traitement thermique (premier essai).

Dilution	10 ⁻¹									10 ⁻²									10 ⁻³											
Milieu	Bennett			GLM			Sabouraud			Bennett			GLM			Sabouraud			Bennett			GLM			Sabouraud					
UFC	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In

2. Second essai

A l'issue de l'essai précédant ayant été majoritairement indénombrable, un second essai a été effectué. Cet essai se caractérise notamment par l'addition d'un traitement supplémentaire consistant à stocker, à température ambiante, durant une certaine période (deux mois dans notre cas) une partie de notre échantillon de sol préalablement traité au CaCo3 (1%). Ce traitement a pour objectif de réduire un peu plus la flore microbienne (hors actinomycètes et autres micro-organismes sporulants) présente dans l'échantillon, afin, d'une part, de faciliter la sélection des actinomycètes, et d'autre part, obtenir des colonies dénombrables, clairement dissociées les unes des autres, et ainsi pouvoir aisément repiquer et isoler les souches qui nous intéressent.

Des dilutions plus élevées allant de 10⁻³ à 10⁻⁵ ont également été appliquées lors de l'ensemencement au cours de ce second essai, afin de faciliter à la fois le dénombrement et l'isolement des souches représentatives.

Nous remarquerons également que la dilution 10⁻³ a été appliquée lors des deux essais ; c'est aussi sur cette dilution que furent retrouvées les quelques boîtes ayant donné lieu à des colonies dénombrables lors du premier essai, ce qui rend possible, en comparant les résultats du dénombrement des deux essais sur cette même dilution, de juger du niveau d'efficacité du traitement par le biais du stockage dans la réduction de la flore microbienne de l'échantillon.

A l'issue de ce second essai, seules deux boites se sont révélées indénombrables (colonies ayant formé des tapis, mais néanmoins dissociables). Les résultats du dénombrement sont consignés dans le tableau suivant.

Tableau XII : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement thermique (second essai).

Dilution		10^{-3}									10^{-4}									10^{-5}								
Milieu		Bennett			GLM			Sabouraud			Bennett			GLM			Sabouraud			Bennett			GLM			Sabouraud		
UFC		In	87	72	56	50	80	47	33	45	36	43	59	61	45	63	47	49	33	42	53	57	37	In	36	24	46	31

En revanche, les cultures issues de l'échantillon traité à la chaleur se sont une fois de plus révélées indénombrables.

Tableau XIII : Dénombrement des culturesensemencées à partir de l'échantillon ayant subi un traitement thermique (second essai).

Dilution		10^{-3}									10^{-4}									10^{-5}								
Milieu		Bennett			GLM			Sabouraud			Bennett			GLM			Sabouraud			Bennett			GLM			Sabouraud		
UFC		In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In	In

Nous remarquons également que les boites de cultureensemencées à partir de la dilution 10^{-5} contiennent relativement peu de phénotypes bactériens (un à deux par boite de culture) comparativement aux boites de culturesensemencées à partir des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} du second essai.

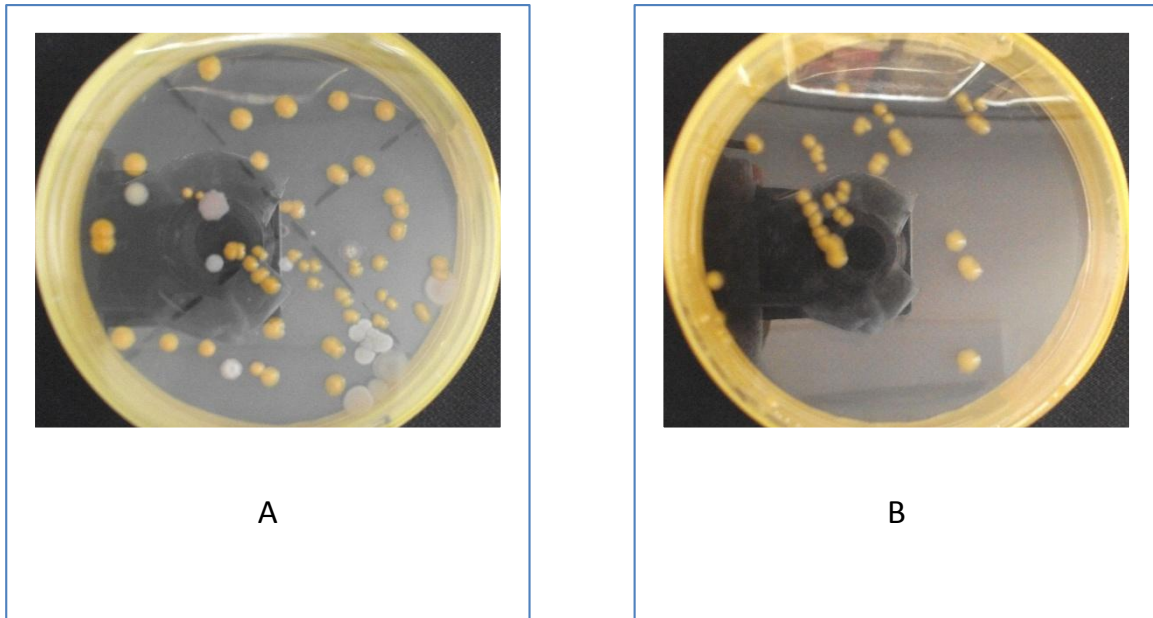


Figure 14 : Diversité phénotypique au niveau des boîtes de culture issues du second essai. (A) boîte de culture issue de la dilution 10^{-3} . (B) boîte de culture issue de la dilution 10^{-5} .

Le résultat du dénombrement des cultures issues du second essai n'ayant pas subi de traitement thermique nous a permis de sélectionner le milieu le plus favorable au développement microbien sur lequel sera effectué l'isolement et la conservation des souches représentatives. Le milieu le plus favorable est donc le milieu Bennett comme le montre la figure suivante.

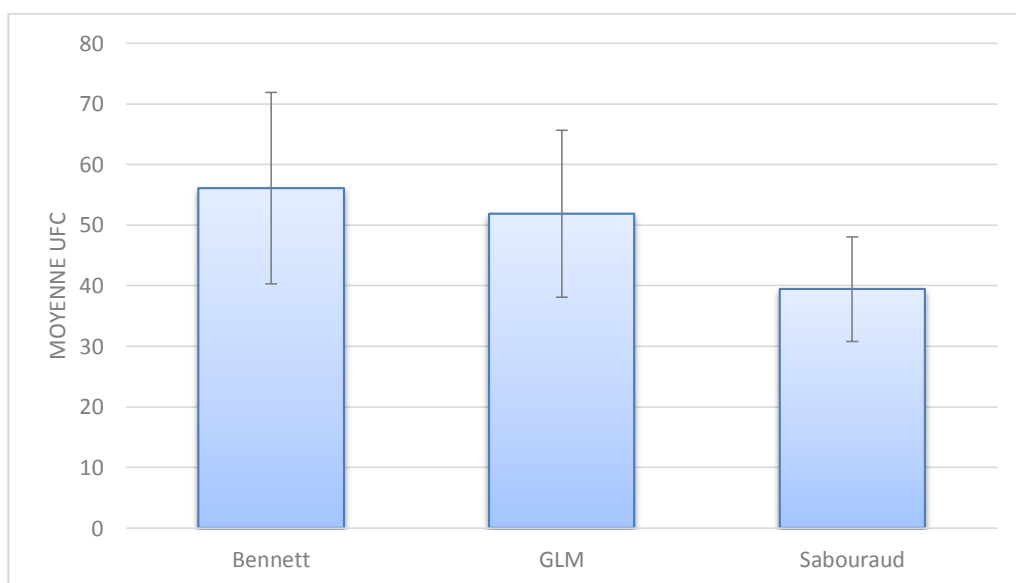


Figure 15 : Moyenne des unités formant colonie par milieu de culture.

Le stockage de l'échantillon de sol a également eu un effet positif sur la réduction de sa charge microbienne ; en effet les données recueillies lors des deux essais à la dilution 10^{-3} montrent une nette réduction des unités formant colonies.

Tableau XIV : Comparaison entre le dénombrement des unités formant colonies du premier et du second essai à la dilution 10^{-3} .

	Premier essai			Second essai		
	UFC	Moyenne	Ecart-type	UFC	Moyenne	Ecart-type
Bennett	In	96	0	In	79,5	7,5
	96					
	72					
GLM	In	80,5	3,5	56	62	12
	84					
	80					
Sabouraud	64	60,33	9,55	47	41,66	5,77
	71					
	45					

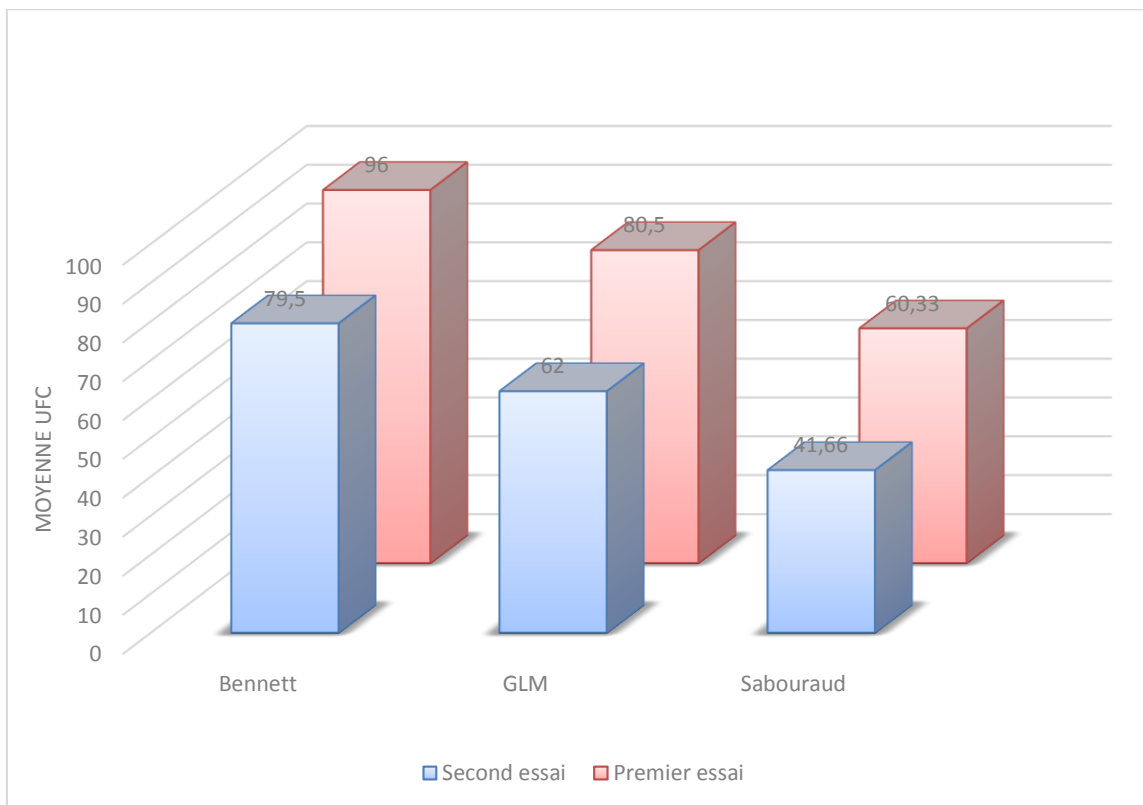


Figure 16 : Histogramme comparatif des moyennes UFC par milieu de culture à la dilution 10^{-3} lors des deux essais.

Les dilutions appliquées au premier et au second essai sont dans l'ordre de 10^{-1} à 10^{-3} et de 10^{-3} à 10^{-5} . Les boîtes issues premier essai ensemencé à partir de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement thermique sont majoritairement indénombrables, seules quelques cultures issues de la dilution 10^{-3} ont pu être dénombrées. Les quelques cultures dénombrables ont surtout été observées sur le milieu Sabouraud en raison de son pH acide inhibant la croissance de certains micro-organismes. A contrario, la très grande majorité des boîtes issues du second essai ensemencé à partir de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement thermique sont dénombrables ; en effet seul deux boîtes s'y sont révélées indénombrables (colonies ayant formé des tapis, mais néanmoins dissociables).

On pourrait donc supposer que les procédés de prétraitements utilisés ne réduisent pas assez la charge microbienne de l'échantillon de façon à exploiter les boîtes ensemencées à partir des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} sans avoir à utiliser de substances inhibitrices.

La charge et la composition microbiennes d'un échantillon de sol donné dépendent également de nombreux autres facteurs. Le pH, la disponibilité des nutriments, la solubilité des métaux, le contenu en carbone et en azote, l'humidité, la salinité, ainsi que les variations climatiques sont des facteurs déterminants de la structure des communautés bactériennes des sols (FIERER *et al.*, 2007 ; LAUBER, 2009).

Autre fait saillant, que nous remarquons lors du second essai, est que les boîtes ensemencées à partir de la solution diluée à 10^{-5} ne contiennent qu'un à deux phénotypes bactériens contrairement aux boîtes ensemencées à partir des dilutions 10^{-3} et 10^{-4} qui contiennent jusqu'à cinq phénotypes bactériens différents.

On peut donc supposer qu'une solution faiblement diluée issue d'un échantillon dont la charge microbienne est relativement élevée aurait tendance à envahir les boîtes ainsi ensemencées, rendant ainsi tout travail d'isolement difficile, voire impossible ; en revanche, une trop forte dilution tendrait à amoindrir la diversité des spécimens microbiens présents dans les boîtes de culture.

Les dilutions utilisées lors de travaux visant à isoler des actinomycètes à partir d'écosystèmes divers varient selon les auteurs. A titre d'exemple BOUDEMAGH (2007) a utilisé lors de ses travaux d'isolement à partir de sols sahariens des dilutions de 10^{-1} à 10^{-7} , la solution mère étant préalablement additionnée d'antibiotiques et d'antifongique. De même pour

DJABELLAH (2010) dans ses travaux d'isolement à partir de sols de sebkha. D'autres auteurs utilisent des plages de dilutions plus restreintes. AOUAR (2012) par exemple, dans ses travaux d'isolement à partir de sols rhizosphériques, utilise des dilutions allant de 10^{-4} à 10^{-7} sans faire usage de quelconque substance inhibitrice ; KITOUNI (2007) dans ses travaux d'isolement à partir de divers écosystèmes extrêmes, utilise des dilutions allant de 10^{-3} à 10^{-5} en alternant entre l'utilisation ou non de substances inhibitrices. Une tendance se dessine quant aux dilutions utilisées lors de ces différents travaux d'isolement. En effet, les auteurs ont tendance à élargir la fourchette des dilutions appliquées à leur échantillon lorsque celui-ci provient d'un écosystème hostile ; à contrario, un échantillon provenant d'un écosystème favorable aura une fourchette de dilutions plus restreinte et sera éventuellement sujet à l'utilisation de substances inhibitrices.

Dans la présente étude, l'isolement que nous tentons d'effectuer concerne un échantillon de sol prélevé aux abords d'une source située à la périphérie d'une zone forestière ; on s'attend à y découvrir une composition microbienne à la fois dense et diversifiée. A la lumière des résultats obtenus et en vue de travaux similaires nous suggérons l'application d'une fourchette de dilutions entre 10^{-3} et 10^{-4} , ceci dans le but d'une part, de disposer de colonies à la fois dénombrables et représentatives des communautés microbiennes de l'échantillon étudié, et d'autre part, de permettre une utilisation plus rationnelle des ressources à disposition.

Le stockage tire avantage de la grande résistance des spores des actinomycètes aux variations de température et à la dessiccation. A court terme, ce procédé faciliterait l'isolement de ces micro-organismes en réduisant la charge microbienne sensible aux variations de température et d'humidité présente dans notre échantillon.

Les résultats du dénombrement du second essai à la dilution 10^{-3} montrent une nette réduction du nombre de colonies par rapport au premier, ce qui laisse supposer que le présent procédé a eu un effet positif sur la réduction de la charge microbienne de l'échantillon. Le présent résultat serait dû à l'effet prolongé du CaCO_3 , la dessiccation et à l'épuisement du substrat au niveau de l'échantillon.

Le traitement thermique à 55°C pendant 1 heure en chaleur humide n'a pas donné l'effet attendu. Selon EI-NAKEEB et LECHEVALIER (1963), une température allant de 55°C à 100°C pendant 1 heure, réduirait considérablement le nombre de bactéries sans affecter celui des actinomycètes ; pourtant nous constatons que les boîtesensemencées à partir des solutions

ayant subi un traitement thermique se sont révélées indénombrables lors des deux essais indépendamment des dilutions appliquées. A ce titre, divers hypothèses sont à envisager : contamination extérieure lors du traitement (notamment lors du chauffage à l'étuve), stimulation de la croissance d'un germe thermophile présent dans le sol, ou éventuellement l'élimination de souches productrices d'antimicrobiens donnant ainsi le champ libre à la prolifération de germes habituellement inhibés par ces souches.

Au vu des résultats obtenus lors du second essai, le milieu Bennett serait le plus favorable à la croissance des actinomycètes. L'inconvénient majeur de notre mode opératoire, s'agissant du choix du milieu plus favorable aux actinomycètes, est qu'à ce stade de l'expérimentation, nous ne pouvons pas nous permettre de contrôler si nos boîtes de cultures contiennent partiellement ou exclusivement des actinomycètes, car cela nécessiterait d'engager d'avantage de temps et de ressources (vérification via coloration de Gram et observation au microscope). Cependant, les prétraitements que nous avons fait subir à notre échantillon de sol sont supposés avoir réduit considérablement sa charge microbienne hors actinomycètes. A titre d'exemple, EL-NAKEEB et LECHEVALIER (1963) ont démontré que plus de 80% des colonies ensemencées à partir d'échantillons traités au CaCO₃ étaient des actinomycètes, ce qui nous laisse à supposer que la grande majorité des colonies issues du second essai sont en fait des actinomycètes, ce qui tend à vérifier nos résultats.

Le choix du milieu le plus favorable n'a pas seulement vocation à optimiser l'isolement des actinomycètes, mais aussi par extension à optimiser la production d'éventuelles substances antimicrobiennes. En effet, un milieu favorisant la production de substances antimicrobiennes permet d'atteindre la CMI plus rapidement et nous permettrait ainsi de déceler plus aisément lors du criblage la présence d'un éventuel pouvoir inhibiteur. Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture, influence énormément la capacité de production des actinomycètes. Une récente étude, où l'activité de 19 souches d'actinomycétales a été testée sur dix milieux différents, a donné le milieu Bennett comme étant le milieu idéal pour la production de substances antimicrobiennes (LOUCIF, 2011). C'est sur la base de ces observations que nous avons décidé d'effectuer l'isolement sur le milieu Bennett.

II. Isolement des souches représentatives

Des colonies de morphologie diverse ont été isolées, dont celles autour desquelles des phénomènes d'inhibition ont pu être constatés. Dans un souci de rationalisation des ressources à disposition un quota de 20 isolats par essai a été mis en place avec un maximum de deux repiquages successifs par isolat lors de la purification.

A l'issue du premier essai, et suite à plusieurs repiquages successifs, 7 souches ont pu être isolées, dont 3 à partir des cultures issues de l'échantillon traité à la chaleur. Nous constatons que sur les 20 isolats prélevés initialement lors de cet essai, moins de la moitié ont pu être purifiés, les autres étant trop contaminés.

En revanche, 20 souches ont pu être isolées lors du second essai, dont 2 à partir des cultures issues de l'échantillon traité à la chaleur. Il est également à noter que les isolats issus de cet essai n'ont pas nécessité autant de repiquages que le premier, en plus d'offrir un rendement optimal car aucune souche initialement repiquée n'a été perdue, les colonies de cet ensemencement étant dénombrables et généralement bien dissociées les unes des autres.

Au total, 27 souches ont été isolées dont 5 provenant des échantillons traités à la chaleur, soit seulement 18% du total des isolats purifiés.

On peut d'ores et déjà constater que le traitement thermique sensé tirer parti de la résistance des spores des actinomycètes aux conditions extrêmes, afin de faciliter leur isolement sélectif, n'a visiblement pas tenu ses promesses en terme de rendement. Les cultures ayant résulté de ce schéma expérimental ont en effet donné lieu à des colonies indénombrables (en totalité), pas forcément bien dissociées les unes des autres, et dont l'isolement a nécessité plusieurs repiquages successifs. A ce titre divers hypothèses ont été émises précédemment quant à la non-viabilité de ce schéma expérimental s'agissant d'isoler des actinomycètes sans avoir recours à des substances inhibitrices.

Le tableau suivant reprend quelques caractères macromorphologiques observés sur les 27 isolats.

Tableau XV : Tableau synthétique des différents caractères macromorphologiques et cultureux des 27 isolats

Isolats		Plan	Surface	Bords	Élévation	Couleur	Consistance	Filaments	Pigments diffusables
R1	SP1	Circulaire	Duveteuse	Filamenteux	Convexe	Jaune virant vers le blanc	Sèche	+	-
R2	SP2	Circulaire	Lisse	Irréguliers	Cratère	Blanche	Crémeuse	-	-
R3	SP3	Irrégulier	Lisse	Irréguliers	Convexe	Crème	Grasse	-	-
R4	SP4	Circulaire	Rugueuse	Ondulés	Convexe	Crème	Grasse	-	-
R5	SP5	Circulaire	Filamenteuse	Filamenteux	Convexe	Jaune virant vers le vert	Sèche	+	-
R6	SP6	Irrégulier	Lisse	Irréguliers	Plate	Crème	Grasse	-	-
R7	SP7	Irrégulier	Lisse	Lobés	Plate	Blanche	Grasse	-	-
R1'	SP8	Circulaire	Lisse avec présence de cercles concentriques à proximité des bords	Irréguliers	Plate	Blanche	Crémeuse	-	-
R2'	SP9	Circulaire	Lisse	Légèrement ondulés	Bombée	Jaune	Crémeuse	-	-
R3'	SP10	Circulaire	Rugueuse	Ondulés	Convexe	Marron claire	Sèche	+	+
R4'	SP11	Irrégulier	Vagues concentriques	Irréguliers	Cratère	Blanche	Crémeuse	-	-

NB : Les annotations R et R' (également visibles sur les figures 18 et 19) ont servi au départ à faire la distinction entre les isolats provenant du premier et du second essai, celles-ci furent ensuite remplacée par l'annotation SP pour des raisons pratiques.

Tableau XV (suite) : Tableau synthétique des différents caractères macromorphologiques et cultureux des 27 isolats.

Isolats		Plan	Surface	Bords	Elévation	Couleur	Consistance	Filaments	Pigments diffusables
R5'	SP12	Circulaire	Lisse	Réguliers	Convexe	Blanche	Crémeuse	-	-
R6'	SP13	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Convexe	Marron	Sèche	+	+
R7'	SP14	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Cratère	Jaune	Sèche	+	-
R8'	SP15	Circulaire	Lisse	Réguliers	Plate	Blanche	Crémeuse	-	-
R9'	SP16	Circulaire	Rugueuse	Ondulés	Cratères	Beiges virant vers noire	Sèche	+	+
R10'	SP17	Circulaire	Filamenteuse	Filamenteux	Mycélium aérien	Blanche	Sèche	+	-
R11'	SP18	Irrégulier	Rugueuse	Irréguliers	Cratère	Sèche	Crémeuse	-	-
R12'	SP19	Irrégulier	Rugueuse	Irréguliers	Cratère	Blanche	Crémeuse	-	-
R13'	SP20	Circulaire	Rugueuse	Dentelés	Bossue	Beige	Sèche	-	+
R14'	SP21	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Bossue	Blanche	Sèche	+	+
R15'	SP22	Circulaire	Rugueuse	Ondulés	Cratère	Jaune	Sèche	-	-
R16'	SP23	Circulaire	Lisse	Ondulés	Bossue	Vertes virant vers le gris	Sèche	+	+
R17'	SP24	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Cratère	Beiges et virent vers le marron	Sèche	+	+
R18'	SP25	Circulaire	Rugueuse	Irréguliers	Plate	Beige	Sèche	+	+
R19'	SP26	Irrégulier	Lisse	Lobés	Plate	Blanche	Crémeuse	-	-
R20'	SP27	Circulaire	Vagues concentriques	Dentelés	Blanche	Blanche	Crémeuse	-	-

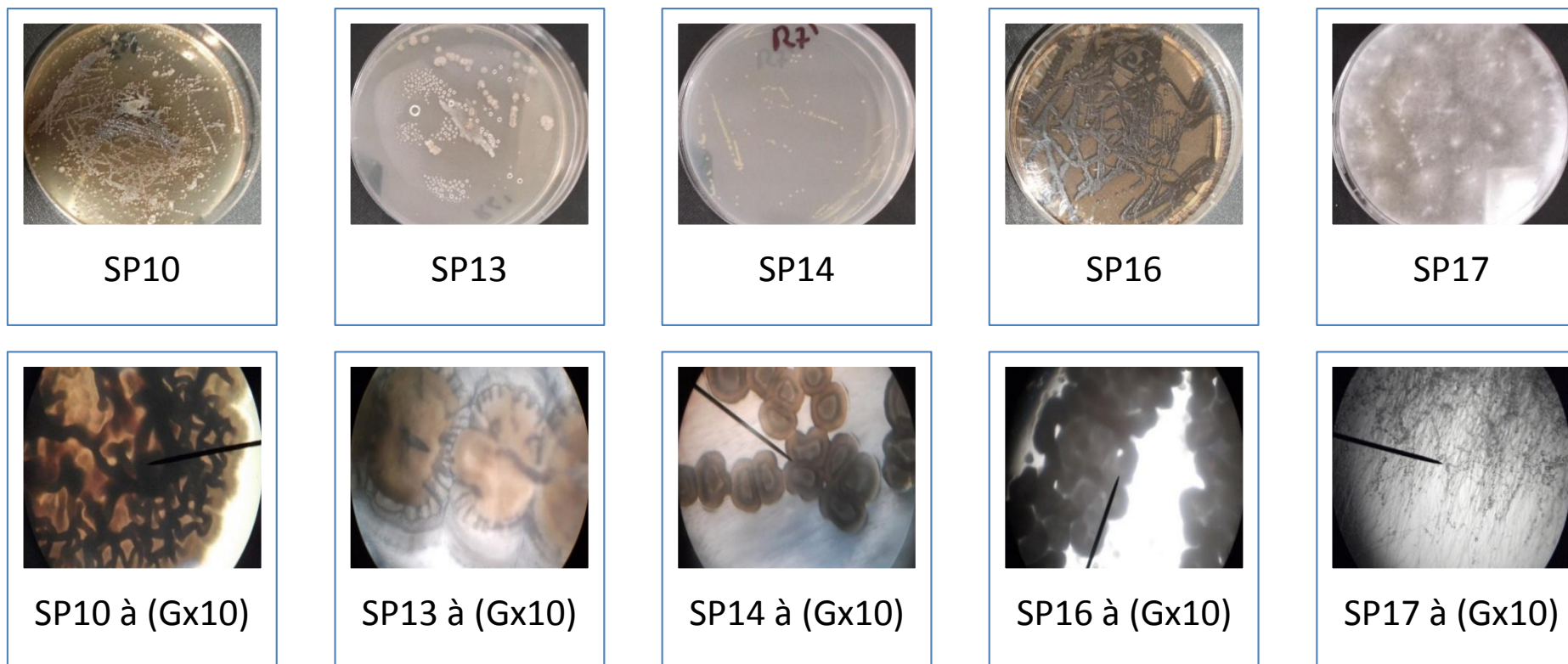


Figure 17 : Quelques isolats observés à l'œil nu et au microscope photonique au grossissement (Gx10).

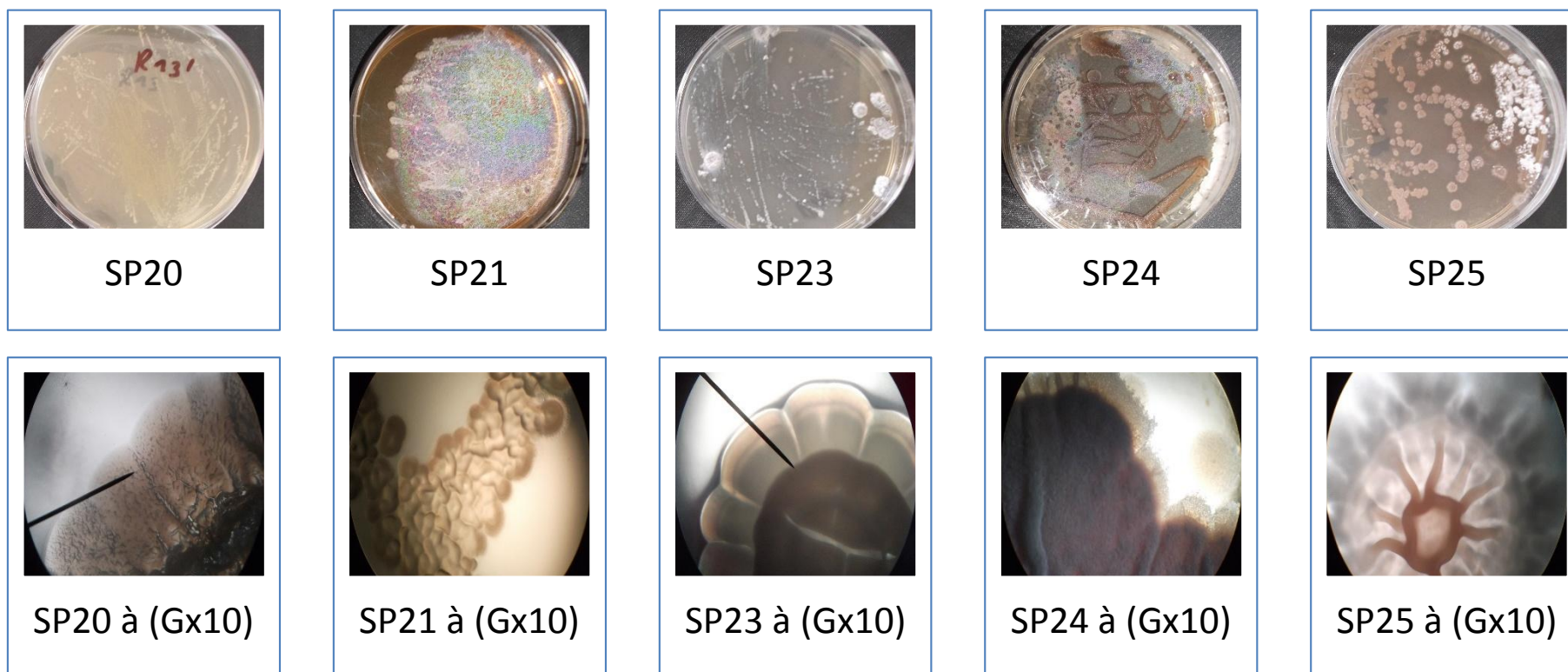


Figure 17 (suite) : Quelques isolats observés à l'œil nu et au microscope photonique au grossissement (Gx10).

Après 7 jours d'incubation, un nombre important de colonies d'une grande variété phénotypique ont été obtenues aussi bien au premier qu'au second essai. Face à une telle abondance et dans un cadre où nous disposons de moyens et de temps limités, une question se pose quant aux colonies devant être retenues lors de l'isolement.

En effet, les actinomycètes ont fait l'objet de nombreuses confusions par le passé, et ont souvent été prises, à tort, pour des champignons filamenteux (GOTTSLIEB, 1973 ; OTTO, 1998), ce qui laisse à penser que l'inverse pourrait éventuellement être possible. D'autre part, certaines espèces d'actinomycètes forment des colonies qui, de prime abord, semblent plus proches morphologiquement des bactéries que des champignons (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012).

De nombreux auteurs s'accordent sur un profil macromorphologique et physiologique plus ou moins général s'agissant de sélectionner, lors d'un isolement, des colonies susceptibles d'appartenir au groupe des actinomycètes : colonies circulaires, le plus souvent sèches, d'aspect fongique, parfois duveteuses, et dont croissance est relativement lente comparativement aux bactéries (KITOUNI, 2007 ; DJABALLAH, 2010 ; MESSAOUDI, 2013).

Il est vrai qu'une grande partie des espèces d'actinomycètes ont un aspect macromorphologique et une physiologie qui correspondent plus au moins au profil précédemment évoqué. Cependant, il existe de nombreuses espèces d'actinomycètes qui ne cadrent pas forcément avec celui-ci. De nombreuses espèces d'actinomycètes produisent par exemple des colonies de consistance crémeuse (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 of Systematic Bacteriology, 2012). De nombreux auteurs ont également rapporté l'existence d'actinomycètes à croissance rapide. Il existe en effet plusieurs espèces de mycobactéries à croissance rapide dites atypiques capables de développer des colonies en un temps d'incubation relativement court, à titre d'exemple les colonies de certaines espèces de *Nocardia* apparaissent après 3 à 7 jours d'incubation (CARRIERE *et al.*, 1999 ; SAUBOLLE et SUSSLAND, 2003 ; Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012). Lors de son étude sur les actinomycètes aérobies pathogènes, AOUAR (2006) a mis en évidence 15 souches capables de développer des colonies en à peine 48 heures. Enfin, les colonies de *Streptomyces Coelicolor* sont capables d'ériger des hyphes aériens en à peine 24 heures, comparativement à une période de 2 à 5 jours requise pour les actinomycètes à croissance relativement lente (NODWELL et LOSICK, 1998).

Ce profil macromorphologique et physiologique, abondamment repris par de nombreux auteurs lors de travaux d'isolement, est certes très utile car il permet de tomber presque à coup sûr sur des actinomycètes ; se limiter à de tels critères nous condamnerait cependant à une relative redondance, où l'on retomberait presque systématiquement sur les mêmes espèces, et où il n'y aurait pas de place pour d'éventuelles nouvelles espèces ne cadrant pas avec ce profil comme il en existe déjà beaucoup. Une analyse strictement basée sur ces critères ne permettrait donc pas de déterminer si telle colonie présente plus d'intérêt qu'une autre lors d'un isolement.

Nous rappelons par ailleurs qu'une quantité non négligeable de facteurs sélectifs favorisant la croissance des actinomycètes ont depuis le début de l'expérimentation été appliqués à nos échantillons, justifiant ainsi une approche moins rigide quant à la sélection des colonies à isoler.

Une autre caractéristique dont sont dotées certaines souches d'actinomycètes, également commune à certaines souches de bactéries et de champignons, nous a interpellé lors de cet isolement, car satisfaisant un critère majeur de notre problématique, qui n'est autre que la capacité à produire des substances inhibitrice, or, des phénomènes d'inhibition autour de nombreuses colonies ont été constatés, celles-ci ont également été isolées. Au final, nous avons choisi lors de l'isolement de nous baser sur deux critères principaux : la diversité morphologique et le pouvoir inhibiteur quand celui-ci est visible.

III. Criblage de l'activité antimicrobienne

1. Criblage de l'activité antibactérienne

1.1. Criblage primaire

Suite au criblage primaire, 23 isolats sur les 27 semblent montrer une activité antimicrobienne contre au moins une des bactéries test, soit un taux de 85,18% sur la totalité des isolats. 22 souches sur les 23 semblent montrer une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, 20 contre *Pseudomonas aeruginosa* et seulement 6 contre *Escherichia coli*. Les résultats du criblage primaire sont repris dans le tableau suivant.

Tableau XVI : Résultats du criblage primaire des 27 isolats contre les 3 bactéries test.

Isolat/Bactérie test		<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>P. aeruginosa</i>
R1	SP1	+	+	+
R2	SP2	-	+	+
R3	SP3	-	-	-
R4	SP4	-	+	+
R5	SP5	-	+	+
R6	SP6	-	+	+
R7	SP7	-	-	-
R1'	SP8	+	+	+
R2'	SP9	-	-	+
R3'	SP10	-	-	-
R4'	SP11	-	+	+
R5'	SP12	-	+	-
R6'	SP13	-	+	+
R7'	SP14	-	+	-
R8'	SP15	-	+	+
R9'	SP16	+	+	+
R10'	SP17	-	+	+
R11'	SP18	+	+	+
R12'	SP19	+	+	+
R13'	SP20	-	+	-
R14'	SP21	-	+	+
R15'	SP22	-	+	+
R16'	SP23	-	+	+
R17'	SP24	+	+	+
R18'	SP25	-	+	+
R19'	SP26	-	+	+
R20'	SP27	-	+	-

+ : Présence d'activité antimicrobienne, - : Absence d'activité antimicrobienne.

La méthode des stries perpendiculaires présente cependant quelques inconvénients quant à l'observation de l'activité antimicrobienne ; en effet certaines souches dont l'optimum de température est à 37°C ont tendance à envahir le milieu très rapidement, ce qui ne facilite pas la lecture. D'autre part, cette méthode de criblage ne permet que de recueillir des données qualitatives (présence ou absence d'inhibition).



Figure 18 : Inhibition *in vitro* de quelques isolats vis-à-vis des bactéries test selon la méthode de criblage des stries perpendiculaires. E : *Escherichia coli*, S : *Staphylococcus aureus*, P: *Pseudomonas aeruginosa*.

1.2. Criblage secondaire

Le criblage secondaire des 27 isolats a finalement confirmé l'activité antibactérienne de 18 souches sur les 23 ayant montré des signes d'activité lors du premier criblage, soit un taux revu à la baisse de 66,66% des isolats. 16 souches sur les 18 semblent montrer une activité antimicrobienne contre *Staphylococcus aureus*, 12 contre *Pseudomonas aeruginosa* et seulement 4 contre *Escherichia coli*.

Les zones d'inhibition autour des cylindres sont mesurées deux fois, l'une perpendiculaire à l'autre (correspondant aux valeurs min/max reproduites au niveau des tableaux XVII et XVII), les souches portées par les cylindres ayant tendance à croître en formant des bords irréguliers. Les moyennes des diamètres d'inhibitions observés varient entre 11mm et 25,5mm. Les résultats du criblage secondaire sont repris dans le tableau suivant. Une répétition a été effectuée trois semaines plus tard afin de confirmer les résultats obtenus. L'activité antimicrobienne des 18 isolats identifiés lors du précédent criblage a été confirmée avec quelques légères variations

au niveau des diamètres d'inhibition et du spectre d'activité. La reproductibilité des résultats est ensuite validée pour chaque isolat par le calcul de l'écart-type et du coefficient de variation.

Tableau XVII : Résultats du criblage secondaire des 27 isolats contre les 3 bactéries test via la technique des cylindres d'agar. Diamètres d'inhibition en mm.

Bactérie test/ Isolat		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		Min/Max	Moyenne	Min/Max	Moyenne	Min/Max	Moyenne
R1	SP1	-	-	12/12	12	-	-
R2	SP2	-	-	17/18	17,5	11/12	11,5
R3	SP3	-	-	-	-	-	-
R4	SP4	-	-	-	-	11/11	11
R5	SP5	-	-	-	-	-	-
R6	SP6	-	-	20/21	20,5	-	-
R7	SP7	-	-	-	-	-	-
R1'	SP8	11/12	11,5	25/26	25,5	14/15	14,5
R2'	SP9	-	-	-	-	-	-
R3'	SP10	-	-	-	-	-	-
R4'	SP11	-	-	19/20	19,5	14/15	14,5
R5'	SP12	-	-	17/19	18	-	-
R6'	SP13	-	-	15/18	16,5	19/20	19,5
R7'	SP14	17/19	18	24/25	24,5	-	-
R8'	SP15	-	-	-	-	-	-
R9'	SP16	18/18	18	24/25	24,5	19/20	19,5
R10'	SP17	-	-	14/15	14,5	19/20	19,5
R11'	SP18	-	-	24/25	24,5	11/12	11,5
R12'	SP19	-	-	21/22	21,5	-	-
R13'	SP20	-	-	17/20	18,5	13/14	13,5
R14'	SP21	-	-	19/20	19,5	11/12	11,5
R15'	SP22	-	-	-	-	12/13	12,5
R16'	SP23	-	-	-	-	-	-
R17'	SP24	12/13	12,5	22/22	22	11/12	11,5
R18'	SP25	-	-	-	-	-	-
R19'	SP26	-	-	20/21	20,5	11/11	11
R20'	SP27	-	-	-	-	-	-

Tableau XVIII : Résultats du criblage tertiaire (répétition) des 27 isolats contre les 3 bactéries test via la technique des cylindres d'agar. Diamètres d'inhibition en mm.

Bactérie test/ Isolat		<i>E. coli</i>		<i>S. aureus</i>		<i>P. aeruginosa</i>	
		Min/Max	Moyenne	Min/Max	Moyenne	Min/Max	Moyenne
R1	SP1	16/17	16,5	20/21	20,5	-	-
R2	SP2	15/16	15,5	24/25	24,5	11/12	11,5
R3	SP3	-	-	-	-	-	-
R4	SP4	12/13	12,5	24/25	24,5	16/17	16,5
R5	SP5	-	-	-	-	-	-
R6	SP6	-	-	-	-	18/19	18,5
R7	SP7	-	-	-	-	-	-
R1'	SP8	12/13	12,5	25/26	25,5	18/20	19
R2'	SP9	-	-	-	-	-	-
R3'	SP10	-	-	-	-	-	-
R4'	SP11	-	-	11/12	11,5	-	-
R5'	SP12	-	-	15/16	15,5	-	-
R6'	SP13	-	-	17/18	17,5	16/17	16,5
R7'	SP14	-	-	24/25	24,5	-	-
R8'	SP15	-	-	-	-	-	-
R9'	SP16	-	-	24/25	24,5	14/15	14,5
R10'	SP17	25/27	26	39/40	39,5	29/30	29,5
R11'	SP18	-	-	25/25	25	14/15	14,5
R12'	SP19	-	-	21/22	21,5	12/13	12,5
R13'	SP20	-	-	-	-	14/15	14,5
R14'	SP21	-	-	25/25	25	23/25	24
R15'	SP22	-	-	-	-	14/15	14,5
R16'	SP23	-	-	-	-	-	-
R17'	SP24	15/16	15,5	18/19	18,5	-	-
R18'	SP25	-	-	-	-	-	-
R19'	SP26	-	-	21/21	21	12/13	12,5
R20'	SP27	-	-	-	-	-	-

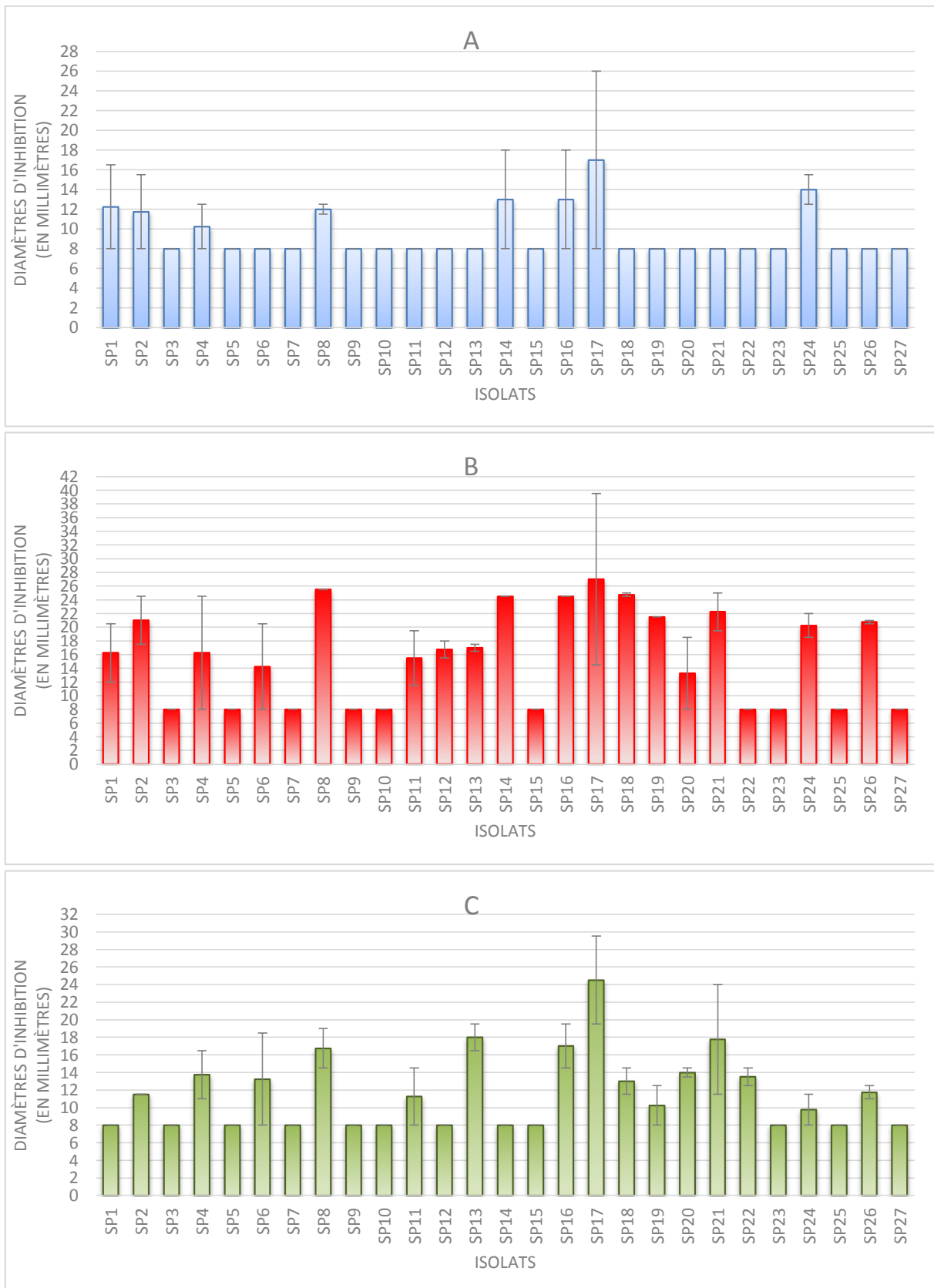


Figure 19 : Moyenne des diamètres d'inhibition obtenus lors des criblages antibactériens secondaire et tertiaire (répétition) réalisés selon la méthode des cylindres d'agar (diamètre des cylindres = 8mm). A : contre *E. coli*, B : contre *S. aureus*, C : contre *P. aeruginosa*.

Tableau XIX : Coefficients de variation (CV) des diamètres d'inhibition calculés entre le criblage antibactérien secondaire et tertiaire pour chacun des isolats contre les trois bactéries test.

Isolat	CV <i>E. coli</i>	CV <i>S. aureus</i>	CV <i>P. aeruginosa</i>
SP1	35%	26%	0%
SP2	32%	17%	0%
SP3	0%	0%	0%
SP4	22%	51%	20%
SP5	0%	0%	0%
SP6	0%	44%	40%
SP7	0%	0%	0%
SP8	4%	0%	13%
SP9	0%	0%	0%
SP10	0%	0%	0%
SP11	0%	26%	29%
SP12	0%	7%	0%
SP13	0%	3%	8%
SP14	38%	0%	0%
SP15	0%	0%	0%
SP16	38%	0%	15%
SP17	53%	46%	20%
SP18	0%	1%	12%
SP19	0%	0%	22%
SP20	0%	40%	4%
SP21	0%	12%	35%
SP22	0%	0%	7%
SP23	0%	0%	0%
SP24	11%	9%	18%
SP25	0%	0%	0%
SP26	0%	1%	6%
SP27	0%	0%	0%

CV <50% : homogène, CV >50% : hétérogène.

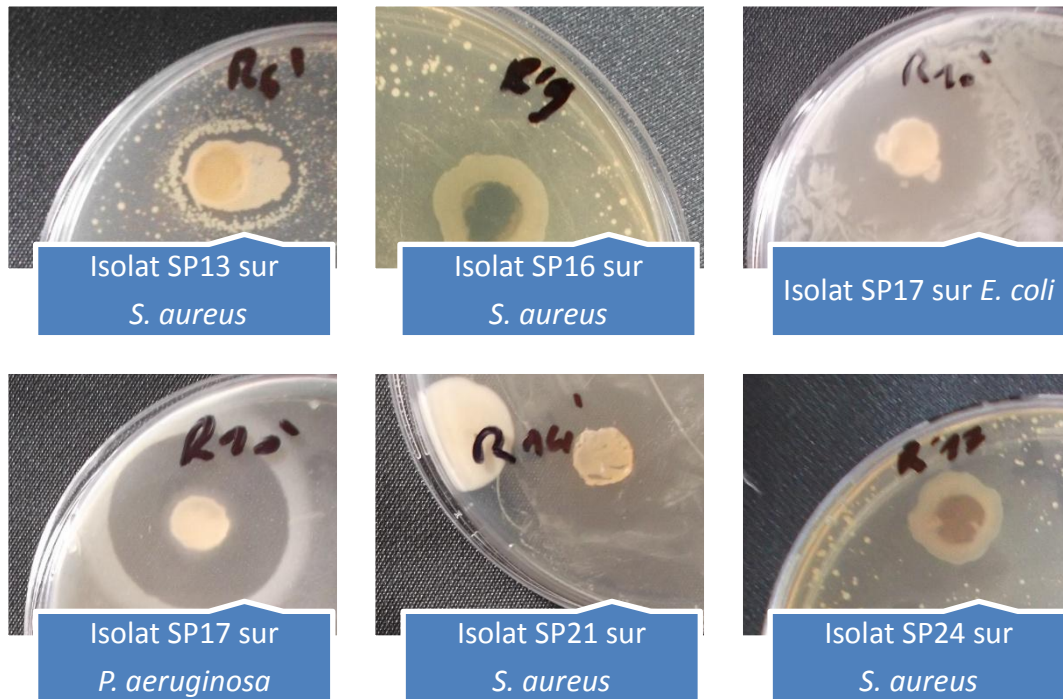


Figure 20 : Inhibition *in vitro* de quelques isolats vis-à-vis des bactéries test selon la méthode de criblage des cylindres d'agar.

Nous constatons des variations relativement importantes du nombre d'isolats actifs par bactérie test entre le premier et le second criblage, et comparativement, une faible variation entre le second criblage et la répétition appliquée à celui-ci, comme le montre la figure suivante.

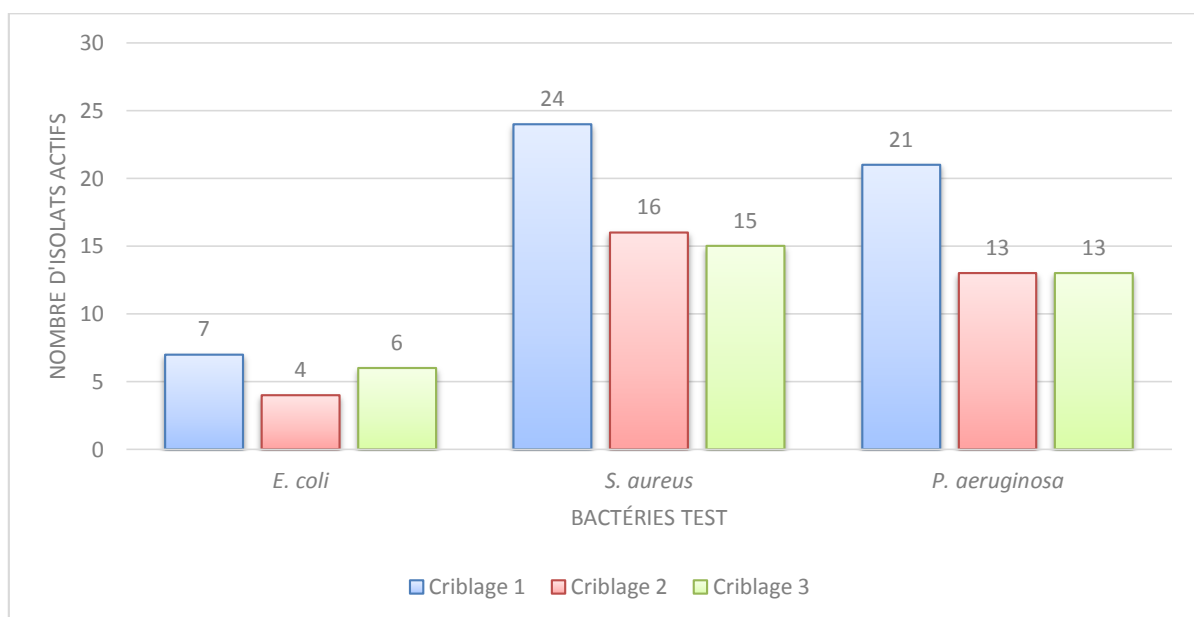


Figure 21 : Nombre d'isolats montrant une activité antibactérienne lors des trois criblages.

Pas moins de 23 isolats sur les 27 ont montré une activité antibactérienne lors du criblage primaire ; en revanche, seulement 18 parmi 23 isolats ont de nouveau montré une activité antimicrobienne lors du second criblage. D'autre part, l'activité antimicrobienne des 18 souches observée durant le second criblage a été confirmée lors du criblage tertiaire (répétition) qui utilise la même méthode de criblage. Des légères variations du spectre d'activité ainsi que des diamètres d'inhibition ont toutefois été observés.

Différentes interprétations pourraient expliquer les différences observées entre le premier et le second criblage. En effet, les méthodes de criblage employées diffèrent l'une de l'autre d'une part, par la manière dont les isolats sont mis en contact avec les bactéries test, et d'autre part, par la quantité de biomasse de l'isolat directement mise en contact avec la bactérie test.

La méthode des stries perpendiculaires consiste tout d'abord ensemercer dans une boîte de culture, tout au long de son diamètre, une strie principale de la souche dont nous voulons tester l'activité antimicrobienne, puis, quelques semaines plus tard (tout dépend du rythme de croissance de la précédente souche), d'y ensemercer perpendiculairement à la strie principale d'autres stries contenant les souches bactériennes sur lesquelles nous voulons tester cette activité. En revanche, la seconde méthode dite des cylindres d'agar, consiste à prélever, à l'emporte-pièce, des cylindres d'agar contenant des colonies des souches dont nous voulons tester l'activité antimicrobienne, et à les déposer sur des boîtes de culture préalablement ensemençées d'une de nos bactéries test. En comparant les deux méthodes, nous constatons dès le départ que la quantité de biomasse de la souche dont nous voulons tester l'activité antimicrobienne répartie le long d'une strie dans la première méthode est nettement supérieure à celle contenue dans un cylindre d'à peine 8mm de diamètre dans la seconde méthode ; la méthode des stries perpendiculaire serait donc plus sensible. Une trop forte accumulation de biomasse, notamment constatée lors du criblage primaire, rend la lecture des résultats beaucoup plus laborieuse, certains isolats étant très envahissants et finissent dans certains cas par recouvrir les zones d'inhibition, ce que l'on ne risque pas de retrouver en appliquant la méthode des cylindres d'agar. La première méthode aurait également tendance à épuiser le substrat et à acidifier le milieu, ce qui pourrait éventuellement produire de faux positifs. Les éventuelles modifications des propriétés physicochimiques du milieu sont également déterminantes de la composition chimique des métabolites ainsi produits et par conséquent de leur activité biologique. Autre différence notable entre les deux méthodes, la partie de l'isolat en contact avec les souches test est plus importante dans la seconde méthode. En effet, la méthode des

cylindres d'agar nous permettrait d'observer un halo d'inhibition tout autour du cylindre sur lequel est porté notre isolat, même dans le cas où celui-ci possède une activité antibactérienne relativement faible vis-à-vis d'une bactérie test. La méthode des cylindres d'agar a aussi l'avantage de fournir des données à la fois qualitatives (présence ou absence de phénomène d'inhibition) et quantitatives (diamètres d'inhibition), ce qui n'est pas le cas de la méthode des stries perpendiculaires qui fournit uniquement des données qualitatives.

Les variations des diamètres d'inhibition constatées entre le criblage secondaire et la répétition sont globalement admissibles. En effet, seuls deux isolats dénotent d'un coefficient de variation dépassant les 50% (seuil d'admissibilité) : SP4 pour *S. aureus* et SP17 pour *E. coli*.

Les légères fluctuations au niveau des diamètres d'inhibition, observées entre le second criblage et la répétition, peuvent être attribuées à divers facteurs influant sur la stabilité de la molécule produite et/ou sur les micro-organismes. Les causes identifiables sont inhérentes aux propriétés intrinsèques du milieu, aux modifications physicochimiques que subit celui-ci lors de la culture, à la nature chimique et la concentration des molécules bioactives produites, aux éventuels mécanismes de résistance des bactéries test, et à la charge microbienne de l'inoculât.

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production de métabolites secondaires biologiquement actifs (STRUB, 2008). Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent 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). Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectent également la production des métabolites secondaires (SMAOUI, 2010).

La méthode des cylindres d'agar fournirait donc des résultats plus précis. En effet l'uniformité des cylindres implique que la quantité de biomasse mise en contact avec les bactéries test est relativement stable. Cette méthode serait tout de même moins sensible que la méthode des stries qui grâce à une quantité de biomasse plus élevée a plus de chance de produire une CMI.

Lors du criblage primaire, 22 souches sur les 23 semblent montrer une activité antimicrobienne contre *S. aureus*, 20 contre *P. aeruginosa* et seulement 6 contre *E. coli*. Ces

chiffres sont toutefois revus à la baisse lors du criblage secondaire dont les éventuelles causes ont précédemment été élucidées ; en effet 16 souches sur les 18 semblent montrer une activité antimicrobienne contre *S. aureus*, 12 contre *P. aeruginosa* et seulement 4 contre *E. coli*. Une tendance semble toutefois se dessiner à partir des données recueillies lors des criblages primaires et secondaires : l'activité antimicrobienne la plus prononcée semble s'exprimer contre *S. aureus* autant quantitativement que qualitativement comparativement aux deux autres bactéries test *P. aeruginosa* et *E. coli*, ce qui nous laisse à supposer que les molécules antimicrobiennes produites par nos isolats ont tendance à avoir plus d'effet sur les bactéries Gram positives. En effet, la paroi des bactéries Gram positive est relativement perméable à la plupart des antibiotiques.

La perméabilité membranaire de *P. aeruginosa* serait également de 10 à 100 fois inférieure à celle d'*E. coli* (YOSHIMURA et NIKAIDO, 1982). Cependant, nous retrouvons au niveau des criblages primaire et secondaire environ trois fois plus d'isolats ayant une activité contre *P. aeruginosa* que contre *E. coli*. En revanche, nous remarquons lors du second criblage que les isolats ayant montré une activité, à la fois contre *P. aeruginosa* et *Escherichia coli*, génèrent des diamètres d'inhibition relativement proches, ce qui laisserait penser que l'activité antibactérienne des molécules produites par ces mêmes isolats s'exprimerait indépendamment de la différence de perméabilité existant entre *P. aeruginosa* et *E. coli*, laissant supposer que la cible des molécules antibactériennes ainsi produites serait un composant de la paroi bactérienne. Les isolats en question sont SP1, SP2, SP4, SP16, SP17 et SP24. Il est cependant conseillé de prendre ces résultats avec la plus grande prudence. En effet, les concentrations des molécules antibactériennes mises en jeu, inhérentes à la méthode des cylindres d'agar, ont tendance à varier d'un isolat à un autre (variabilité physiologique entre les isolats) ; de plus les CMI de ces molécules vis-à-vis des bactéries test nous sont inconnues.

1.3. Criblage de l'activité antifongique

La méthode retenue pour effectuer le criblage antifongique est la méthode des cylindres d'agar. Divers raisons expliquent ce choix : en effet cette méthode est plus rapide et nécessite moins de ressources que la méthode des stries perpendiculaires dans laquelle il faut préalablement pré-incuber durant une semaine la souche dont nous voulons tester le pouvoir inhibiteur. De plus, la méthode des cylindres d'agar permet de recueillir des données quantitatives mesurables exprimées sous la forme de diamètres d'inhibition.

Les 18 souches ayant précédemment montré une activité antibactérienne ont donc été testées contre *Candida albicans* via la méthode des cylindres d'agar. Le criblage antifongique n'a cependant pas donné de résultats, la souche test n'ayant pas réussi à se développer (souche vieille et/ou mal conservée). Des phénomènes d'inhibition vis-à-vis de contaminants d'aspect fongique ont tout de même pu être observés quelques semaines plus tard au niveau des souches SP15, SP16, SP18, SP19 et SP23. Au vu des moyens limités dont nous disposions alors, nous n'avons pas été en mesure d'effectuer de plus amples investigations à ce sujet. La question reste donc ouverte.

IV. Sélection des actinomycétales bioactives et caractérisation biochimique des souches représentatives

1. Sélection des actinomycétales parmi les isolats ayant montré une activité antimicrobienne

Les souches ayant montré une activité antimicrobienne lors du premier et du second criblage ont été ensuite soumises à une coloration de Gram. Parmi celles-ci, 16 se sont révélées être à coloration de Gram positive soit 88% des isolats bioactifs ; en revanche une seule souche s'est révélée être à coloration de Gram négative (SP12), et une autre acido-alcool-résistante (SP20) ne prenant pas la coloration de Gram ; en effet, les bactéries dotées de cette caractéristique apparaissent quelquefois Gram positif mais sont le plus souvent non observables. Des filaments ont également pu être observés chez 7 des souches Gram positives (SP1, SP13, SP16, SP17, SP21, SP22 et SP24) ; ces deux critères combinés suffisent à eux seuls à classer ces souches dans le groupe des actinomycètes.

L'acido-alcool-résistance de la souche SP20, dont l'aspect filamenteux n'a pas pu être mis en évidence par la coloration de Gram, représente toutefois un indice non négligeable quant à son identification. En effet, il n'existe à ce jour que trois genres dotés de cette caractéristique dans le monde bactérien ; il s'agit des genres *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus*, et il s'avère également que ces trois genres appartiennent tous au groupe des actinomycètes ; d'autre part, l'aspect général des colonies produites par cette souche est caractéristique du genre *Mycobacterium*, ce qui au final nous donne un total de 8 souches, soit 44,44% des isolats bioactifs.

Tableau XX : Résultats de l'observation des isolats ayant montré une activité antimicrobienne à (Gx100) après coloration de Gram.

Isolat	SP1	SP2	SP4	SP6	SP8	SP11	SP12	SP13	SP14	SP16	SP17	SP18	SP19	SP20	SP21	SP22	SP24	SP26
Caractère Gram	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	BAAR	+	+	+	+
Filaments	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-

+ : Bactérie Gram positive, - : Bactérie Gram négative, BAAR : Bactérie acido-alcool-résistante (pas de coloration).

2. Caractérisation biochimique des souches représentatives

2.1. Sélection des souches représentatives

Parmi les 8 souches d'actinomycètes possédant une activité antimicrobienne, 5 ont été sélectionnées pour caractérisation biochimique. Ce choix est en partie motivé par les modestes moyens mis à notre disposition.

Le critère dont nous tenons compte ici en priorité est la pureté de la souche. Il serait en effet mal placé d'engager des ressources dans des manipulations dont résulterait des données que nous pourrions éventuellement remettre en cause : la souche SP1 ayant été sujette à une contamination fongique est donc éliminée.

Le second critère à prendre en considération dans cette sélection est le spectre d'activité : la souche SP22, dont le spectre d'activité ne touche qu'une seule bactérie test et dont l'activité antimicrobienne est jugée négligeable (active contre *Pseudomonas* seulement avec un diamètre d'inhibition de 11mm lors du second criblage), est donc éliminée à son tour.

Le dernier critère mis en avant dans cette sélection est l'amplitude des diamètres d'inhibition : ainsi parmi les souches restantes, la souche SP20 semble posséder l'activité la plus faible. Les souches sélectionnées sont donc SP13, SP16, SP17, SP21 et SP24.

Tableau XXI : Sélection de 5 souches selon les critères de pureté, du spectre d'activité et de l'amplitude des diamètres d'inhibition.

Caractères /Souches	SP1	SP13	SP16	SP17	SP20	SP21	SP22	SP24
Pureté	Contaminée	Pure	Pure	Pure	Pure	Pure	Pure	Pure
Spectre d'activité	2/3	2/3	3/3	3/3	2/3	2/3	1/3	3/3
Activité antimicrobienne contre les 3 souches test (moyennes des criblages secondaire et tertiaire)								
<i>Escherichia coli</i>	16,5	-	18	26	-	-	-	14
<i>Staphylococcus aureus</i>	16,25	17	24,5	27	18,5	22,25	-	20,25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	18	17	24,5	14	17,75	13,5	11,5
Retenue	-	+	+	+	-	+	-	+

2.2. Caractérisation biochimique

a. Recherche de la β -galactosidase

Après préparation des suspensions et ajout des disques ONPG, nous constatons au bout d'une heure l'apparition de la couleur jaune au niveau des tubes contenant les souches SP13 SP16 SP21 et SP24 ; elles sont donc ONPG+. Le tube contenant la souche SP17 reste transparent, celle-ci est donc ONPG négative.

b. Recherche de l'oxydase

Après préparation des suspensions et ajout des disques d'oxydase nous constatons, en un peu moins d'une minute, l'apparition de la couleur violette au niveau des tubes contenant les souches SP13 SP16 SP21 et SP24 ; elles sont donc oxydase+. Le tube contenant la souche SP17 reste transparent ; celle-ci est donc oxydase négative.

c. Recherche de la Catalase

Un phénomène d'effervescence a été observé sur l'intégralité de souches testées après les avoir mises en contact avec de l'eau oxygénée ; celles-ci sont donc catalase positives.

d. Recherche de la Nitrate réductase

Le même schéma réactionnel a été observé sur l'intégralité des souches testées. Pour rappel, les nitrates peuvent servir d'accepteurs d'électrons pour former des nitrites (stade 1) ; parfois la réduction peut être poursuivie jusqu'au stade diazote (stade 2). Des tubes contenant de bouillon nutritif de nitrates de potassium sontensemencés, puis incubés à 28°C°. Au bout de 7 jours d'incubation, l'ajout de 3 gouttes des réactifs NRI et NRII aux suspensions microbiennes n'engendre aucune réaction particulière ; le milieu ne contient donc pas de nitrites, ce qui laisserait supposer que soit ces derniers sont transformés en diazote (stade 2), soit la souche microbienne ne possède pas de Nitrate réductase. Nous y ajoutons donc de la poudre de Zinc ayant pour effet de réduire les nitrates en nitrites, ce qui n'engendre une fois de plus aucune réaction particulière, les réactifs ajoutés précédemment ne régissant pas avec ces nitrites. Les nitrates ont donc été transformés par la bactérie en nitrites puis la dénitrification a permis l'obtention de diazote ; la réaction est donc fortement positive (stade 2). Nos 5 isolats possèdent donc une Nitrate réductase.

e. Etude de la fermentation des sucres (Glucose, Lactose, Saccharose) et recherche du caractère H₂S

Pour rappel, la concentration du glucose dans le milieu TSI est abaissée au 1/10ème 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, entraînant un retour rapide à la coloration rouge ou bien à une réalcalinisation plus prononcée. Après 7 jours d'incubation à 28°C, une réalcalinisation du milieu, se traduisant par une couleur rouge vif, a en effet été observée au niveau du tubeensemencé de la souche SP16 ; les tubesensemencés des souches SP13, SP17, SP21 et SP24 ont gardé leur coloration rouge d'origine. D'autre part, toutes les souches que nous testons ont à la base été isolées et cultivées sur des milieux additionnés de glucose. L'intégralité des souches testées fermentent donc le glucose.

Nous constatons également que la pente des tubes contenant les souches SP3, SP17 et SP24 vire très légèrement au jaune ; celles-ci fermentent donc le saccharose et/ou le lactose.

Aucun des cinq tubes ne présente de coloration noire, ni de présence de bulles ou de fragmentation de la gélose ; celles-ci sont donc H₂S-, Gaz-.

f. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

Après 7 jours d'incubation à 28°C, le tube de milieu Citrate de Simmons, ensemencé de la souche SP17, est la seule à avoir viré vers le bleu. Pour rappel, 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 ; la souche SP17 fermente donc le citrate. Les souches SP13 SP16 SP21 et SP24 n'ont pas pu se développer sur les tubes de milieu Citrate de Simmons, ces derniers ont naturellement gardés leur couleur d'origine.

g. Caractère mannitol et mobilité

Après 7 jours d'incubation à 28°C, un virage progressif vers le jaune a été constaté sur l'intégralité des tubes. 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. L'intégralité des souches testées fermentent le mannitol. La présence d'un trouble homogène n'a par ailleurs pas pu être constatée sur l'intégralité des souches testées ; celles-ci sont donc immobiles.

h. Détermination de la voie d'attaque des glucides

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

- le tube ensemencé de la souche SP13, non additionné de vaseline, montre un léger virage vers la couleur jaune en surface, le fond du tube reste rouge ; le tube additionné de vaseline quant à lui reste rouge ; la souche SP13 possède donc un métabolisme oxydatif ;
- le tube ensemencé de la souche SP16, non additionné de vaseline, vire complètement à la couleur jaune ; le tube additionné de vaseline quant à lui reste rouge ; la souche SP16 possède donc un métabolisme oxydatif ;
- le tube ensemencé de la souche SP17, non additionné de vaseline, vire complètement à la couleur jaune ; le tube additionné de vaseline quant à lui vire partiellement vers la couleur jaune ; la souche SP16 possède donc un métabolisme fermentatif ;

- le tube ensemencé de la souche SP21, non additionné de vaseline, montre un léger virage vers la couleur jaune en surface, le fond du tube reste rouge ; le tube additionné de vaseline quant à lui reste rouge ; la souche SP21 possède donc un métabolisme oxydatif ;
- le tube ensemencé de la souche SP24, non additionné de vaseline, vire complètement à la couleur jaune ; le tube additionné de vaseline quant à lui vire complètement à la couleur jaune ; la souche SP24 possède donc un métabolisme fermentatif.

i. Caractères RM et VP

Les réactions RM et VP sont négatives sur l'intégralité des tubes de Milieu Clark et Lub ensemencés des bactéries testées.

j. Production d'indole

Après 7 jours d'incubation à 28°C, les tubes de milieu EPE ensemencés des souches testées, l'indole est mis en évidence par l'addition du réactif de Kovacs. L'apparition d'un anneau rouge a été observée au niveau des tubes ensemencés des souches SP13, SP16, SP21, SP24 ; celles-ci produisent donc de l'indole.

k. Croissance à différentes températures

Les isolats retenus ont été incubés durant 7 jours 37°C et à 42°C. Nous avons pu observer précédemment que l'intégralité des souches retenues avaient une croissance relativement soutenue à 28°C. La souche SP 17 est la seule à montrer une très légère croissance à 37°C ; les résultats de l'incubation à 42°C sont naturellement négatifs.

Tableau XXII : Tableau synthétique de quelques caractères biochimiques de cinq souches d'actinomycètes productrices de molécules antimicrobiennes.

Isolat Caractère	SP13	SP16	SP17	SP21	SP24
Voie d'attaque des glucides (MEVAG)	Oxydatif	Oxydatif	Fermentatif	oxydatif	fermentatif
Catalase	+	+	+	+	+
β-galactosidase (ONPG)	-	+	-	+	+
Oxydase	+	+	-	+	+
Nitrate réductase	+	+	+	+	+
Mobilité	-	-	-	-	-
Mannitol	+	+	+	+	+
Citrate	-	-	+	-	-
Glucose	+	+	+	+	+
Saccharose et/ou Lactose	+	-	+	-	+
H₂S	-	-	-	-	-
Gaz	-	-	-	-	-
RM	-	-	-	-	-
VP	-	-	-	-	-
Indole	+	+	-	+	+
Croissance à 28°C	++	++	++	++	++
Croissance à 37°C	-	-	+	-	-
Croissance à 42°C	-	-	-	-	-

+ : Résultat positif, ++ : Résultat hautement positif, - : Résultat négatif.

Sur les 18 souches soumises à la coloration de Gram, 16 se sont révélées à coloration de Gram positive, un à coloration de Gram négative, et une acido-alcool-résistante. Ces résultats dénotent d'une relative efficacité des méthodes de traitement précédemment appliquées à notre échantillon contre les bactéries Gram négatives et les champignons. Cependant, seulement 8 isolats sur les 18 actifs sont effectivement des actinomycètes, soit un taux de 44,44% des isolats dotés d'une activité antimicrobienne. La présence de 9 bactéries Gram positives, dénotent de l'insuffisance des traitements que nous avons appliqués à notre échantillon, bien que d'une efficacité relative vis-à-vis des bactéries Gram négatives et des champignons. Le problème délicat lors de l'isolement des actinomycètes reste le développement des bactéries à coloration de Gram positive dont la croissance est envahissante, comme les bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile, voire impossible. L'addition d'antibiotiques anti-Gram positif permet de réduire de façon considérable le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ne sont pas sans effets sur les actinomycètes qui appartiennent au groupe des bactéries à coloration de Gram positive (KITOUNI, 2007). Nous rappelons par ailleurs que l'activité antimicrobienne des isolats non retenus, après coloration de Gram et observation au microscope, est avérée, bien qu'ils ne semblent pas appartenir au groupe des actinomycètes ; ils feront donc l'objet de plus amples investigations ultérieurement.

Sur les 27 isolats cumulés lors des deux essais, 8 sont effectivement des actinomycètes dotés d'une activité antimicrobienne, ce qui nous donne un rendement global d'environ 30%. Nous retrouvons un actinomycète doté d'une activité antimicrobienne parmi les 7 isolats recueillis lors du premier essai, soit un taux de 14,28%. En revanche, 7 souches sur les 20 isolées lors du second essai se sont révélées être des actinomycètes possédant une activité antimicrobienne, soit un taux de 35%. On peut d'ores et déjà en conclure que les conditions appliquées au second essai sont nettement plus favorables que celles du premier s'agissant de pratiquer un isolement d'actinomycètes aux propriétés antimicrobiennes.

Il apparaît également que 100% des souches d'actinomycètes présentant une activité antimicrobienne ont été isolées à partir des cultures ensemencées à partir de l'échantillon n'ayant pas subi de traitement thermique. En effet, le traitement des échantillons de sol à la chaleur est utilisé pour l'isolement sélectif de quelques genres d'actinomycètes habituellement retrouvés dans des milieux extrêmes tel que les genres *Thermomonospora*, *Thermoactinomyces*, *Microbispora* et *Streptosporangium* et ne convient pas à certains genres comme les *Streptomyces* qui ne résistent pas à ce type de traitement. Ce résultat, bien qu'infructueux, revêt

néanmoins une valeur non négligeable du point de vu taxonomique. En effet, il est très probable que l'on retrouve au moins une souche appartenant au genre *Streptomyces* parmi celles que nous avons isolées, d'une part à cause de sa distribution élevée dans les sols de l'ordre de 95% par rapport aux autres genres (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1967), et d'autre part du fait de leur intolérance aux traitements thermiques (LARPENT *et al.*, 1989).

Conclusion et perspectives

Parmi les nombreuses propriétés des actinomycètes, leur capacité à produire diverses substances d'intérêt, dont les antimicrobiens. L'arsenal pharmaceutique actuel est en grande partie dérivé de produits naturels issus des actinomycètes. On leur attribue en effet plus de 90% des antibiotiques actuellement utilisés ainsi qu'environ deux tiers de l'ensemble des substances bioactives découvertes (HAMAKI *et al.*, 2005).

Dans une volonté d'augmenter la probabilité de découverte de nouvelles molécules antimicrobiennes, les recherches se tournent de plus en plus vers des genres moins fréquents, provenant d'environnement peu communs voire extrêmes (DEMAIN et LANCINI, 2006). Cette recherche de nouveaux outils thérapeutiques s'inscrit dans une problématique de santé publique majeure qui est l'émergence et la dissémination à grande échelle des bactéries multirésistantes.

Les principaux objectifs du présent travail étaient d'une part l'isolement de souches d'actinomycétales éventuellement productrices de nouvelles molécules antimicrobiennes, et d'autre part, de poser les bases d'un mode opératoire visant à isoler ces micro-organismes sans avoir recours à l'usage de substances inhibitrices, par le biais de méthodes peu agressives vis-à-vis des micro-organismes cibles éventuellement sensibles à ces substances.

L'objectif principal de cette étude à bien entendu été atteint : un total de 27 souches ont été isolées et ont fait l'objet d'un criblage en milieu solide. Ainsi, l'activité antibactérienne des 27 isolats a été testée sur trois souches de référence (*Escherichia coli*, ATCC 25922 ; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923). Au terme du second criblage, pas moins de 18 isolats sur 27 ont montré des signes d'activité antimicrobienne, soit un taux de 66,66%. L'intégralité de ces 18 isolats se sont montrés actifs vis-à-vis d'au moins une bactérie test, parmi lesquels 13 sont hautement actifs contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition entre 20 et 27 mm, 4 présentant une activité contre les 3 bactéries test et un isolat particulièrement actif contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 30 mm. Les résultats obtenus à ce stade de l'expérimentation témoignent de la grande richesse de cette région en termes de souches microbiennes d'intérêt biotechnologique.

La coloration de Gram a révélé que parmi les 18 isolats dont nous avons précédemment mis en évidence l'activité antimicrobienne, seules 8 possèdent les attributs caractéristiques du groupe des actinomycètes, soit 44,44% des isolats actifs.

Un protocole type a également pu être cerné s'agissant d'isoler de façon sélective des actinomycètes bioactifs ; nous préconisons donc l'application de méthodes de prétraitement telles que le séchage à l'air ainsi que l'usage du carbonate de calcium pour leur rôle dans la réduction de la flore microbienne non ciblée tout en favorisant la croissance des actinomycètes de l'échantillon de sol ; ces deux méthodes de traitement sont aujourd'hui des valeurs sûres dont l'efficacité a été démontrée à maintes reprises. Les effets de réduction de la charge microbienne consécutifs au stockage, bien qu'avérées, ne furent considérés jusqu'ici comme étant plus un fait inévitable du conditionnement des échantillons biologiques, plutôt qu'une méthode de traitement à part entière. L'originalité apportée consiste en une approche combinatoire entre d'une part, le traitement au carbonate de calcium précédemment appliqué à l'échantillon, et d'autre part, du stockage de ce même échantillon à moyen terme. Nous remarquons ainsi que la somme des deux procédés dénote d'une efficacité non négligeable quant à la réduction de la flore microbienne, ayant en plus le mérite d'être peu ou pas agressive vis-à-vis de cibles microbiennes d'intérêt éventuellement sensibles à des traitements sélectifs plus poussés.

Une autre méthode destinée à réduire la flore microbienne au sein de notre échantillon tout en favorisant la croissance des actinomycètes, consiste en un traitement thermique à 55°C en chaleur humide de notre échantillon préalablement mis en suspension pendant 1 heure. En effet, selon EL-NAKEEB et LECHEVALIER (1963), une température allant de 55°C à 100°C pendant 1 heure, réduirait considérablement le nombre de bactéries sans affecter celui des actinomycètes. Ce traitement c'est cependant révélé inefficace : les boîtesensemencées à partir des solutions ayant subi un traitement thermique se sont révélées indénombrables lors des deux essais indépendamment des dilutions appliquées. A ce titre, diverses hypothèses sont été évoquées lors de la discussion dont la plus plausible est sans doute celle d'une contamination lors de l'étuvage, des conditions d'asepsie rigoureuses sont donc de mise lors de l'application de ce type de traitement.

Concernant les dilutions, nous préconisons l'application de la série allant de 10^{-3} à 10^{-5} appliquée lors du second essai ayant donné lieu à des boîtes dotées de colonies dénombrables

en grande majorité, ce qui s'en ressent sur le rendement de l'isolement, comparativement au premier essai où des dilutions allant de 10^{-1} à 10^{-3} y ont été appliquées.

Enfin, pour clore ce volet traitant du mode opératoire, la méthode de criblage dite des cylindres d'agar nous paraît plus indiquée s'agissant de rechercher des signes d'activité antimicrobienne comparativement à la méthode des stries perpendiculaire qui, pour n'évoquer que cela, ne fournit que des données qualitatives à l'expérimentateur.

Au terme de ce travail, et aux vues des nombreuses questions qu'il soulève, nous envisageons d'effectuer de plus amples investigations sur bon nombres d'axes jugés pertinents dont :

- l'identification de nos isolats par le biais de méthodes moléculaires, dont la plus simple serait de procéder au séquençage de l'ARNr 16s ;
- un criblage élargi vis-à-vis d'avantage de souches microbiennes, notamment contre des souches pharmaco-résistantes ;
- une culture en milieu liquide nous permettrait de procéder à une extraction des molécules bioactives, et ainsi d'effectuer un criblage par la méthode des disques de papier ; cette méthode a en effet moins d'inconvénients comparativement à celles utilisées lors notre étude, et nous permettrait entre autre d'assurer une meilleur reproductibilité de nos résultats ;
- l'identification des molécules ainsi produites, leur nature chimique, leurs cibles et leurs CMI et CMB vis-à-vis des souches étudiées ;
- l'identification des isolats non actinomycetales ayant montré une activité antimicrobienne significative ;
- l'optimisation des paramètres culturels afin d'améliorer la production des substances antimicrobiennes ;
- l'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de plusieurs paramètres ;
- une étude *in vivo*, afin de tester l'activité des molécules antimicrobiennes produites par nos isolats en milieu biologique et d'en évaluer la toxicité.

Références bibliographiques

AHMED A. (1968). Mechanism of inhibition of protein synthesis by spiramycin. *Biochim. Biophys. Acta.*,166(1): 205 – 17.

AJIJUR R. M. D., ZAHIDUL I. M. D., KHONDKAR P., ANWAR U. I. M. D. (2010). Characterization and antimicrobial activities of a polypeptide antibiotic isolated from a new strain of *Streptomyces parvulus*. *Bangladesh Pharm J.* 13: 14 – 16.

ALEXANDER M. (1977). Introduction to Soil Microbiology. John Wiley and Sons, Inc., New York.

ALFEROVA I. V., TEREKHOVA L. P. (1988). Use of the method of enriching of soil samples with calcium carbonate for isolation of Actinomyces. *Antibiot Khimiote.* 33(12): 888 – 890.

AMANULLAH A., JUSTEN P., DAVIES A., PAUL G. C., NIENOW A. W., THOMAS C. R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.*, 5 (2): 109 – 114.

ANDREMONT A., CORPET D., COURVALIN P. (1997). La résistance des bactéries aux antibiotiques. *Pour la science*, 232: 66 – 73.

ANZAI Y., SAKAI A., LI W., IIZAKA Y., KOIKE K., KINOSHITA K., KATO F. (2010). Isolation and characterization of 23-O-mycinosyl-20-dihydro-rosamicin: a new rosamicin analogue derived from engineered *Micromonospora rosaria*. *J. Antibiot.*, 63: 325 – 328.

AOUAR L. (2012). Isolement et identification des actinomycètes antagonistes des microorganismes phytopathogènes. Thèse de doctorat en microbiologie appliquée. Université Mentouri, Constantine.

AOUICHE A., BIJANI C., ZITOUNI A., MATHIEU F., SABAOU N. (2014). Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* spp. PAL114 isolated from a Saharan soil. *Journal of Medical Mycology.*, 24 (2): 17 – 23.

AOYAGI T., YAGISAWA M., KUMEGAI M., HAMADA M., OKAMI Y., TAKEUCHI T. (2006). An enzyme inhibitor, Panostalin produced by *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics.*, 24: 860-869.

ASOLKAR R. N., KIRKLAND T. N., JENSEN P. R., FENICAL W. (2010). Arenimycin, an antibiotic effective against rifampin- and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from the marine actinomycete *Salinispora arenicola*. *J. Antibiot.*, 63(1): 37 – 39.

BAKER B., LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13: 236 – 243.

BELYAGOUBIL. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat en biologie. Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen.

BERDY J. (2005). Bioactive microbiol metabolites. *Journal of antibiotics.*, 58: 1 – 26.

BOECK L. D., MERTZ F. P. (1986). A47934, a novel glycopeptide-aglycone antibiotic produced by a strain of *Streptomyces toyocaensis* taxonomy and fermentation studies. *J Antibiot.*,39(11): 1533 – 40.

BOUCHEFFA K. (2011). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : identification des souches productrices et essai de caractérisation des antifongiques produits. Thèse de 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.

BRESSOLIER P., LETOURNEAU F., URDACI M., VERNEUIL B., (1999). Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 65: 2570 – 2576.

CARBON C., BAX R. P. (1998). Regulating the use of antibiotics in the community. *Brit. Med. J.*, 317: 663 – 665.

CARLE S. (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel.* 36: 25 – 41.

- CARLE S. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important *Pharmactuel*, 42(2): 6 – 21.
- CARRIERE C., MARCHANDIN H., ANDRIEU J.M., VANDOME A. PEREZ C. (1999).** *Nocardia thyroiditis*: Unusual location of infection. *J. Clin. Microbiol.*, 37 (7): 2323 – 2325.
- CAVALLA M. ET EBERLINBERLIN T., (1994).** Isolement des streptomycètes du sol. L'opéron, 19: 13 – 17.
- CHAIN E. B., FLOREY H. W., GARDNER A. D. (1940).** Penicillin as a chemotherapeutic agent. *Lancet.*, 24: 226 – 231
- CHUN J., BLACKALL L. L., KANG S., HAH Y. C., GOODFELLOW M. (1997).** A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall *et al.* as *Skermania piniformis* gen. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Bact.* 47: 127 – 131.
- 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. *J. Gen. Microbiol.*, 118: 29 – 37
- CRAWFORD D. L., LYNCH J. M., WHIPPS J. M., OUSLEY M. A. (1993).** Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 3899 – 3905.
- DANIEL R. (2004).** The soil metagenome, a rich resource for the discovery of novel natural products. *Cur. Opin. Biotechnol.*, 15: 199 – 204.
- DEMAIN A. L., LANCINI G. (2006).** Bacterial pharmaceutical products in prokaryotes. In: "Prokaryote: A handbook on the biology of bacteria". Springer, New York, USA. 1: 812 – 833.
- DJABALLAH C. (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérantes isolés de la Sebkhia Ain M'lila. Thèse de magistère en microbiologie. Université Mentouri, Constantine.
- DOOLITTLE W. (1999).** Phylogenetic classification and the universal tree. *Science.*, 284: 2124 – 2128.

- ECKWALL E. B., SCHOTTEL J. L. (1997).** Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogene* strain PonSSII. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 19: 220 – 225.
- EL-NAKEEB M. A., LECHVALIER H. A., (1963).** Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 11: 75 – 77.
- EL-TARABILY K. A. (2006).** Rhizosphere-competent isolates of streptomycete and non-Streptomycete actinomycetes capable of producing cell-wall degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of cucumber. *Can. J. Bot.* 84: 211 – 222.
- ENSIGN J. C., NORMAND P., BURDEN J. P., YALLOP C. A. (1993).** Physiology of some actinomycete genera. *Res. Microbiol.*, 144(8): 657– 660.
- ERRAKHI R., BOUTEAU F., LEBRIHI A., BARAKATE M., 2007.** Evidences of biological control capacities of *Streptomyces* spp. Against *Sclerotium rolfsii* responsible for damping-off disease in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 23: 1503 – 1509.
- EUNICE J. A., PROSSER J. I. (1983).** Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor*. A3(2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.*, 129: 2029 – 2036.
- FAUGIER A. (2010).** Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs minoritaires « the rare biosphere ». Thèse de Doctorat en microbiologie. Ecole Centrale de Lyon.
- FENICAL W., BADEN D., BURG M., DE GOYET C. V., GRIMES J. D., KATZ M., MARCUS N. H., POMPONI S., RHINES P., TESTER P., VENA J. (1999).** Marine derived pharmaceuticals and related bioactive compounds. In: “from monsoon to microbes: Understanding the Ocean’s Role in Human Health”, National Academies Press, 71 – 86.
- FIERER N., BREITBART M., NULTON J., SALAMON P., LOZUPONE C., JONES R., ROBESON M., EDWARDS R. A., FELTS B., RAYHAWK S., KNIGHT R., ROHWER F., JACKSON R. B. (2007).** Metagenomic and small-subunit RNA analyses reveal the high genetic diversity of bacteria, archaea, fungi, and viruses in soil. *Applied and Environmental Microbiology.*, 73: 7059 – 7066.

FLATT P. M., WU X., PERRY S., MAHMUD T. (2013). Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. *J. Nat. Prod.*, 76: 939 – 946.

FLEMING A. (1929). On the antibacterial action of cultures of a *Penicillium*, with special reference to their use in the Isolation of *B. influenzae*. *British Journal of Experimental Pathology.*, 10: 226 – 236.

GAUDY C., BUXERAUD J. (2005). Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Collection Pharma. Elsevier. France.

GAZENKO S. V., REPONEN T. A., GRINSHPUN S. A., WILLEKE K. (1998). Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64 (11): 4410 – 4415.

GETHA K., VIKINESWARY S., WONG W. H., SEKI T., WARD A., GOODFELLOW M. (2005). Evaluation of *Streptomyces* sp. strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 32: 24 – 32.

GOODFELLOW M., STACH J. E., BROWN R., BONDA A. N., JONES A. L., MEXSON J., FIEDLER H. P., ZUCCHI T.D., BULL A.T. (2012). *Verrucosispora maris* sp. nov., a novel deep-sea actinomycete isolated from a marine sediment which produces abyssomicins. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 101: 185 – 193.

GOODFELLOW M., WILLIAMS S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37: 189 – 216.

GOODFELLOW M., WILLIAMS S.T., MORDARSKI M. (1984). Introduction to and importance of the actinomycetes. In: « The biology of the actinomycetes ». Academic Press. London, UK.

GOTTLIEB D. (1973). General consideration and implication of the Actinomycetales. In: “Actinomycetales characteristics and practical importance”. Edited by G. Sykes and F. A. Skinner. Academic Press, London, UK.

GRIGOROVA R., NORRIS J. R. (1990). Techniques in microbial ecology. In: “Methods in Microbiology”, Vol. 22. Academic Press. London, UK.

- GROTH I., VETTERMAN R., SCHUETZE B., SCHUMANN P., SAIZ-JIMENEZ C. (1999).** Actinomycetes in Karstic caves northern Spain. *J. Microbiol. Methods.*, 36: 115 – 122.
- HAANSUU J. P., (2002).** Demethyl (C-11) cezomycin a novel calcimycin antibiotic from the symbiotic, N₂ fixing actinomycete *Frankia*. Academic Dissertation in General Microbiology. Helsinki.
- HAMAD B. (2010).** The antibiotics market. *Nature Reviews Drug Discovery.*, 9: 675 – 676.
- HAMAKI T., SUZUKI M., FUDOU R., JOJIMA Y., KAJIURA T., TABUCHI A., SEN K., SHIBAI H. (2005).** Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *Journal of bioscience and bioengineering.* 99(5): 485 – 492.
- HASEGAWA T., LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. A. 1978.** New genus of the Actinomycetales: Actinosynnema gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 28(2): 304 – 310.
- HILALI L., KHATTABI A., NSSARLAH N., MALKI A., FINANCE C. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev. Biol. Biotech.*, 2(1): 49 – 53.
- HIRAMATSU K., HANAKI H., INO T., YABUTA K., OGURI T., TENOVER F. C. (1997).** Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vancomycin susceptibility. *J. Antimicrob. Chemother.*, 40 (1):135 – 136.
- HOLT J. G., KRIEG N. R., SNEATH P. H. A., STALEY J. T., WILLIAMS S. T. (1994).** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore.
- HOPWOOD D. A. (2003).** Streptomyces genes: from Waksman to Sanger. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, 30(8): 468 – 471.
- HOPWOOD D. A. (2007).** Streptomyces in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York, Oxford University Press.
- HOPWOOD D. A., LYDIATE D. J., MALPARTIDA F., WRIGHT H. M. (1985).** Conjugative sex plasmids of Streptomyces. *Basic Life Sci.* 30: 615 – 634.

HOPWOOD D.A., SERMONTI, G. (1962). The genetics of *Streptomyces coelicolor*. *Advan. Genet.*, 11: 273 – 342.

HOZZEIN W. N., AHMED M. B., ABDEL TAWAB M. S. (2008). Microbial community structure in a wastewater treatment plant in Beni-Suef City. *New Egypt. J. Microb.*, 20: 189 – 201.

HU H., OCHI K. (2001). Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by including combined resistant mutations. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 1885 – 1892.

HÜTTER R. (1967). Systematik der Streptomyceten unter besonderer Berücksichtigung der von Ihnen gebildeten Antibiotika. *Bibl. Microbiol. Fax.*, 6: 1 – 382.

HUTTER, R. (1965). Die Gattungen der Actinomycetales. *Pathol. Microbiol.*. 28: 567 - 574.

INOUE O. O., NETTO W., S., PADILLA G., FACCIOTTI M. C. R. (2007). Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology*. 38: 58 – 61.

JANA S., DEB J. K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70(2): 140 – 150.

JINENEZ J. T., STURDIKOVA M., STURDIK E. 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca*. 2: 63 – 74.

KECHA M. (1996). Isolement et sélection de deux souches de streptomycetes productrices d'antifongiques non polyeniques : Taxonomie, extraction, purification, et caractérisation partielle des antibiotiques synthétisés. Thèse de doctorat en microbiologie des industries agro-alimentaires. UMMTO, Tizi-Ouzou.

KEULEN G. V., JONKERS H. M., CLOSSON D. WOSTON H. A. B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185(4): 1455 – 1458.

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.

LABEDA D.P., TESTA R. T. LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER. H. A. (1984). *Saccharothrix*: a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34: 426 – 431.

LACEY J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: “Actinomycetales: characteristics and practical importance”. Academic press. London, UK. 231 – 251.

LACEY J. (1988). Actinomycetes in biodegradation and as pollutants of working environment. In: “Actinomycetes in biotechnology”. Academic press. London, UK.

LARPENT J. P., SANGLIER J. J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481p.

LAUBER C. L., HAMADY M., KNIGHT R., FIERER N. (2009). Pyrosequencing-based assessment of soil pH as a predictor of soil bacterial community structure at the continental scale. *Appl. Environ. Microbiol.*, 75(15): 5111 – 5120.

LAVIGNE J. P. (2007). Effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier – Nîmes.

LE MINOR L., VERON M. (1989). Bactériologie médicale. 2 ème édition. Flammarion. Paris, p. 335 – 349.

LECHEVALIER H. A., LECHEVALIER M. P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: “*The prokaryotes*”, Vol. 2. Springer. Verlag, Berlin. 1915 – 1922.

LECHEVALIER H.A., LECHEVALIER M.P. (1967). Biologie of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21: 71 – 100.

LECHEVALIER M. P. (1988). Actinomycetes in agriculture and forestry. In: “Actinomycetes in biotechnology”. Academic press., London, UK.

LECHEVALIER M. P. (1989). Actinomycetes in agriculture and forestry. In: “Actinomycetes in biotechnology”. Academic Press, Inc., New York. 327 – 358.

LECHEVALIER M. P. LECHEVALIER H., (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. j. Syst. Bacteriol.*, 20: 435 – 443.

LECHEVALIER M. P., DE BIEVRE C. AND LECHEVALIER H. A., (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition. *Bioch. Syst. Ecol.*, 5: 249 – 260.

LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: “Biology of industrial microorganisms”. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. 315 – 360.

LECHEVALIER M. P., LECHEVALIER H.A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In: “Actinomycetes taxonomy”, special publication 6. Arlington, Virginia, USA. 225 – 291.

LECHEVALIER M. P., PRAUSER H. LABEDA D. P. RUAN. J. S. (1986). Two new genera of nocardioform actinomycetes, *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 36: 29 – 37.

LIU S., LIU S. Y., LU Z. X. 2007. Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese Journal of Biotechnology*. 23: 1077 - 1081

LOPES A., COELHO R. R, MEIRELLES M. N. I., BRANQUINHA M. H., AND VERMALHO A. B., (1999). Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Mem. Inst. Oswaldo. Cruz.*, 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 magistère en microbiologie. Université Mentouri, Constantine. Thèse de doctorat en biologie.

LOZNIIEWSKI A., RABAUD C. 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prévention du risqué infectieux. Centre de Coordination de lutte contre les infections Nosocomiales. CCLIN, Sud-Est, Nancy.

- LYNCH J. M., CROOL N. E. (1992).** Biological control systems. *Chem. Br.* 42 – 45.
- MADIGAN M., MARTINKO J. (2007).** Brock-Biologie des micro-organismes. 11^{ème} édition. Pearson Education. France.
- MALIK V. S. (1972).** Chloramphenicol. *Adv Appl Microbiol*, 15: 297 – 336.
- MARIAT F., SEBALD M. (1990).** Les actinomycètes. In : « Bactériologie médicale ». Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- MARTIN J. F., DEMAÏN A. L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 44(2): 230 – 251.
- MIGHELEZ E. M., HARDISSON C. MAUZANAL M. B. (2000).** Streptomycètes: a new model to study cell death. *Int Microbiol.* 3(3): 153 – 158.
- MINNIKIN D. E., GOODFELLOW. M. (1981).** Lipids in the classification of actinomycètes. *Zentralbl. Bakteriol.*, 11: 99 – 109.
- MITSUIKI S., SAKAI M., MORIYAMA Y., GOTO M., FURUKAWA K. (2002).** Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkalophilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 66: 164 – 167.
- MOORE B. S., TRISCHMAN J. A., SENG D., KHO D., JENSEN P. R., FENICAL W. S. (1999).** Antiinflammatory Depsipeptides from a marine Streptomycètes. *J.Org. Chem.*, 64: 1145 – 1150.
- MORAKCHI H. (2011).** Isolement et identification de souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives au niveau du lac Oubeira: étude morphologique, physiologique, moléculaire et spectre d'activité.
- MOUTON Y., BINGEN E., DEBOSCKER Y., DUBREUIL L. (2000).** Antibiotiques, Antiviraux, Anti-infectieux. John Libbey Eurotext. Paris.
- NAIDENOVA M., VLADIMIROVA D. (2002).** Isolation and taxonomic investigation of *actinomyces* from specific biotops in Bulgaria. *J. Cul. Coll.*, 3: 15 – 24.

- NANJWADE B. K., CHANDRASHEKHARA S., PRAKASH S., GOUDANAVAR M. S., FAKIRAPPA V. M. (2010).** Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.*, 9: 332 – 340.
- NODWELL J. R., LOSICK R. (1998).** Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.*, 180(5): 1 334 – 1337.
- NONOMURA H., Y. OHARA. (1969).** Distribution of actinomycetes in soil. VII. A culture method effective for both preferential isolation and enumeration of *Microbispora* and *Streptosporangium* strains in soil. Classification of the isolates. *J. Ferment. Technol.* 47:(70) 1 – 709.
- OMURA S., IWAI Y., TAKAHASHI Y., SADAKANE N., NAKAGAWA A., OIWA H., HASEGAWA Y., IKAI T. (2006).** Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics.*, 32: 255 – 261.
- OPPEGARD L. M., HAMANN B. L., STRECK K. R., ELLIS K. C., FIEDLER H. P., KHODURSKY A. B., HIASA H. (2009).** *In vivo* and *in vitro* patterns of the activity of simocyclinone D8, an angucyclinone antibiotic from *Streptomyces antibioticus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 53(5): 2110 – 2119.
- OTTO. H. J. (1998).** Écologie forestière. Institut pour le développement forestier, Paris.
- 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.
- OUHDOUCH Y., BARAKATE M., FINANCE C. (2001).** Actinomycetes of maroccan habitats: isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Biol.*, 37(2): 69 – 74.
- PELMONT J. (2005).** Biodégradation et Métabolisme. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences. France.
- PERRY J. J., STALEY J. T., LORY S. (2004).** Microbiologie. Dunod, Paris.

PETROSYAN P., GARTIA-VARELA M., LUZ-MADRIGAL A., HUITRON C. FLORES M. E. (2003). *Streptomyces mexicanus* ep. Nov., a xylanolytic micro-organism isolated from soil. *Int. J. Sys. Budevo. Microbiol.*, 53: 269 – 273.

POCHON J., TRADIEUX P., (1962). Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Edition de la tourelle, St Mandé. 110 – 111.

PORTER J. N., WILHEM J. J., TRESNER H. D. (1960). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl Microbiol.*, 8(3): 174 – 178.

PORTER J.N. (1971). Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.*, 14: 73 – 92.

PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (1995). Microbiologie. De Boeck, Bruxelles.

PRESCOTT L. M., HARLEY J. P., KLEIN D. A. (2003). Microbiologie. 2ème édition. De Boeck & Larcier. Bruxelles.

PRESCOTT L. M., WILLEY J. M., SHERWOOD L. M., WOOLVERTON C. J. (2013). Microbiologie. 4e édition. De Boeck, Bruxelles.

READING C., COLE M. (1977). Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents. Chemother.*, 11(5): 852 – 7.

REPONEN T. A., GAZENKO S. V., GRINSHPUN S. A., WILLEKE K., COLE E. C. (1998). Characteristics of airborne actinomycete spores. *Appl. Environ. Microbiol.*, 64: 3807 – 3812.

ROYET J., DZIARSKI R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat. Rev. Microbiol.*, 5(4): 264 – 77.

SABAOU N. (1988). Contribution à l'étude des actinomycetales des sols de palmeraies algériennes : systématique et écologie. Thèse de doctorat en sciences naturelles. USTHB, Alger.

- SAFFROY S. (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France.
- SANGLIER J. J., TRUJILLO M. (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 12(3): 269 – 276.
- SAUBOLLE M. A., SUSSLAND D. (2003).** Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J. Clin. Microbiol.*, 41: 4497 – 4501.
- SHEARER M. C. (1987).** Methods for the isolation of non-streptomycete actinomycetes. *Dev. Indust. Microbiol.* 28: 91 – 97.
- SHIRAI M., OKUDA M., MOTOHASHI K., IMOTO M., FURIHATA K., MATSUO Y., KATSUTA A., SHIZURI Y., SETO H. (2010).** Terpenoids produced by actinomycetes: isolation, structural elucidation and biosynthesis of new diterpenes, gifhornenolones A and B from *Verrucosispora gifhornensis* YM28-088. *J Antibiot.* 63(5): 245 – 50.
- SINGLETON P. 2005.** Bactériologie pour la médecine, la biologie et les biotechnologies. Ed Dunno, 6ème édition. Sciences SUP.
- SMAOUI S. (2010).** Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France.
- SRINIVASAN M. C., LAXMAN R. S., DESHPANDE M. V. (1991).** Physiology and nutrition aspects of actinomycetes – An overview. *World Journal of Microbial and Biotechnology*, 7: 171 – 184.
- STACKEBRANDT E., RAINEY F. A., WARD-RAINEY N. L. (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 47(2): 479 – 491.
- STANECK J. L., ROBERTS G. D. (1974).** Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.*, 28(2): 226 – 231.

- STRUB C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France.
- TAESHOWISAN T., PEBERDY J. F., LUMYONG S. (2003).** Isolation of endophytic actinomycetes from selected plants and the antifungal activity. *Wor. J. Microbiol. Biotechnol.*, 19 (4): 381 – 385.
- TAKAHASHI Y., IWAI Y., OMURA S. 1986.** Clostomicins, new antibiotics produced by *Micromonospora echinospora* subsp. *armeniaca* subsp. Nov. II. Taxonomic study of the producing microorganism. *J. Antibiot.* 39(10): 1505 – 1507.
- TAKIZAWA M., COLWELL R. R., HILL R. T. (1993).** Isolation and diversity of actinomycetes in the chesapeake bay. *Appl. Environ. Microbiol.*, 59: 997 – 1002.
- TANAKA S., IGARASHI K., KAJI A. (1972).** Studies on the action of tetracycline and puromycin. *J. Biol. Chem.*, 247(1): 45 – 50.
- TENOVER F. C. (2006).** Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria, *Am. J. Med.*, 119: 3 – 10.
- THEILLEUX J. (1993).** Les actinomycètes. In: « Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel ». Lavoisier, Paris. 425 – 479.
- TRAUT R. R., MONRO R. E. (1964).** The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. *J. Mol. Biol.*, 10(1): 63–72.
- VAN DER WAAIJ D., NORD C. E. (2000).** Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *Int J Antimicrob Agents.*, 16 (3): 191 – 7.
- 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. Mol. Biol. Rev.*, 71(3): 495 – 548.
- VOLLMER W., BLANOT D., DE PEDRO M.A. (2008).** Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol. Rev.*, 32 (2): 149 – 67.

WADETWAR R. N., PATIL A. T. (2013). Isolation and characterization of bioactive actinomycetes from soil in and around Nagpur. *IJPSR.*, 4(4): 1428 – 1433.

WAKSMAN S. A. (1959). The actinomycetes; Vol 1. Nature, occurrence and activities. The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

WAKSMAN S. A. (1963). Ma vie avec les microbes. Editions Albin Michel, 280 p.

WAKSMAN S. A. (1967). Distribution, isolation and methods of study. In: “The actinomycetes. A summary of current knowledge”. The Ronald Press Company. New York. 9 – 21.

WAKSMAN S. A., HENRICI A. T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycete. *J. Bacteriol.*, 46: 337 – 341.

WALSH, C. (2000). Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406(6797): 775–781.

WATAVE M. G., TICKOO R., JOG. M. M., BHOL B. D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.*, 176: 386 – 390.

WEHRLI W., KNÜSEL F., SCHMID K., STAEHELIN M. (1968). Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 61(2): 667 – 73.

WHITMAN W. B., COLEMAN D. C., WIEBE W. J. (1998). Perspective prokaryotes: the unseen majority. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 95: 6578 – 6583.

WHITMAN W. B., GOODFELLOW M., KÄMPFER P., BUSSE H. J., TRUJILLO M. E., LUDWIG W., SUZUKI K. I. (Eds.) (2012). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5, 2nd Edition. Springer.

WILLIAMS S. T., LANNING S., WELLINGTON E. M. H. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: “The Biology of the Actinomycetes.” Academic press, London, UK. 481 – 528.

WILLIAMS S. T., SHARPE M. E., HOLT J. G., (1989). Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Vol.4. Williams & Wilkins. Baltimore. U.S.A.

WILLIAMS S.T., WELLINGTON E. M. H. (1982). Principales and problems of selective isolation of microbes. In: Bioactive microbial products: Search and discovery. Academic Press, London. 9 – 26.

YALA D., MERAD A. S., MOHAMEDI D., OUAR–KORICHI M. N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. In: "Medicine du Maghreb", 91: 5 – 12.

YOSHIMURA F., NIKAIDO H. (1982). Permeability of *Pseudomonas aeruginosa* outer membrane to hydrophilic solutes. *J Bacteriol.*, 152(2): 636 – 42.

ZAZI N. (1994). Essai sur l'évolution de la résistance des bactéries aux antibiotiques. Cas du Staphylocoque pathogène avec application dans la thérapeutique de l'ostéomyélite hématogène. Mémoire de de D.E.S. en microbiologie. UMMTO, Tizi-Ouzou.

ZHANG B., CAI G., WANG H., LI D., YANG X., AN X., TIAN Y., ZHENG W., ZHENG T. (2014). *Streptomyces alboflavus* RPS and its novel and high algicidal activity against harmful algal bloom species *Phaeocystis globosa*. *PLoS ONE*, 9(3): e92907.

ZHI X. Y., LI W. J., STACKEBRANDT E. (2009). An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 59(3): 589 – 608.

ZIMMERMAN W. (1990). Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.*, 13: 199 – 130.

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE LA SANTE, DE LA POPULATION ET DE LA REFORME HOSPITALIERE
CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE "NEDIR MOHAMMED" DE TIZI-OUZOU

3èmes journées nationales de pharmacie du CHU de TIZI-OUZOU

« Place et rôle de la pharmacie hospitalière dans le système de santé national »

LE 26 & 27 Novembre 2014

Attestation de communication



Mr/Mme/Melle : **Mr A. BEN YAOU**

A présenté la communication affichée intitulée : **Isolement de souches d'Actinomycètes productrices de molécules bioactives à partir d'échantillons de sol collectés aux abords d'une source d'eau située dans la région de Tizi Ouzou**

Co-auteurs : , **Dr A.OUELHADJ ; Dr P.KUSCHK**

*Le S/Directeur
des produits pharmaceutiques*

Dr R. MAACHA

C.H.U TIZI-OUZOU
*Le S/ Directeur du Produit
Pharmaceutique*
Dr MAACHA . R
Pharmacien Coordinateur

Le DAPM

Dr NEMMAR

C. H. U TIZI-OUZOU
Dr A. NEMMAR
Directeurs Pharmaceutiques
Et Parapharmaceutiques

Le Président du Comité d'Organisation

Dr Pr A.ZIRI

CENTRE HOSPITALO-UNIVERSITAIRE DE TIZI-OUZOU
Pr A ZIRI

Directeur Général

L'Association Tunisienne de Biotechnologie



Organise

Les Journées Internationales de Biotechnologie (2014)

20-24 Décembre 2014

Hôtel Riu Marco Polo, Yasmine Hammamet (Tunisie)

Correspondance :

Association Tunisienne de Biotechnologie
Route Sidi Mansour Km 6 B.P. 1177 3018 Sfax
Tél./Fax: +216 74 870 692; E-mail : atbiotech@cbs.rnrt.tn
CCB / BIAT: 08304000352002224331 Sfax
SWIFT: BIATTNTTASFX

Matricule fiscal: 1361035/B

Attestation d'acceptation: Affiche

Le comité d'organisation des Journées Internationales de Biotechnologie (**JIB2014**) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (**A.T. Biotech**) a le plaisir de vous informer que votre résumé intitulé, « Isolement de souches d'actinomycètes productrices de molécules bioactives à partir d'échantillons de sol collectés aux abords d'une source d'eau située dans la région de Tizi-Ouzou » au nom de Mme/Melle/Mr. Ben yaou Akli est accepté en tant qu'une **communication par affiche** durant les JIB2014 qui auront lieu à Hammamet du 20 au 24 Décembre 2014. Afin de confirmer votre participation, prière de s'inscrire via le site web : <http://www.atbiotech.org/> avant le 5 Novembre 2014.

En cas de non confirmation dans les délais, votre participation sera automatiquement rejetée.

الجمعية التونسية
للتقانات الحيوية
A.T. BIOTECH.
Téléfax : 74 870 692

S. Bejar

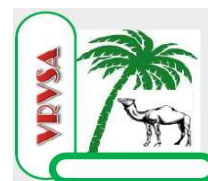
**Le comité d'organisation
Prof. Samir BEJAR**

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Tahri Mohamed. Béchar
Faculté des sciences de la nature et de la vie
Département de Biologie



En partenariat avec :

La Société Algérienne de Microbiologie (SAM)



Et

Le laboratoire de la Valorisation des Ressources Végétales et Sécurité Alimentaires des Zones Semi-arides du Sud ouest Algérien (VRVSA).

Objet : Lettre d'invitation aux « 21^{èmes} JNM 2015 »

Béchar, le 01/10/2015

Lettre d'invitation

Mr. BEN YAOU Akli

Le comité d'organisation des 21^{èmes} Journées Nationales de Microbiologie qui se tiendront les **08 et 09 Novembre 2015**, à Béchar, a le plaisir de vous informer que votre proposition de communication intitulé : « **Isolement de souches d'actinomycètes productrices de substances antibactériennes à partir d'échantillons de sol collectes aux abords d'une source d'eau située dans la commune d'Ain El Hammam.** » a été retenue pour une communication affichée.

Dans l'attente du plaisir de vous recevoir dans la wilaya de Béchar, nous vous prions d'agréer nos meilleures salutations et souhaiterions vous voir parmi nous au séminaire.

Le président du comité d'organisation

Dr. AMROUCHE A.
MICROBIOLOGIE
Sécurité Sanitaire des Aliments

Contacts 21 JNM- BECHAR

BP 417 Université de Bechar, 08000 - Algérie.
GSM : +213556233760 / +213772808243
E-mail: jnm21bechar@gmail.com
SiteWeb : <http://www.univ-bechar.dz>

L'Association Tunisienne de Biotechnologie



Organise

Les Journées Internationales de Biotechnologie (2015)

20-24 Décembre 2015
Hôtel Riu Palm Azur, Djerba (Tunisie)

Correspondance :

Association Tunisienne de Biotechnologie
Route Sidi Mansour Km 6 B.P. 1177 3018 Sfax
Tél./Fax: +216 74 870 692; E-mail : atbiotech@cbs.rnrt.tn
CCB / BIAT: 08304000352002224331 Sfax
SWIFT: BIATTNTTASFX

Matricule fiscal: 1361035/B

Attestation d'acceptation: Affiche

Le comité d'organisation des Journées Internationales de Biotechnologie (**JIB2015**) de l'Association Tunisienne de Biotechnologie (**A.T.Biotech**) a le plaisir de vous informer que votre résumé intitulé, « Isolement de souches d'actinomycètes productrices de substances antibactériennes à partir d'échantillons de sol collectés aux abords d'une source d'eau située dans la commune d'Ain El Hammam. » au nom de Mme/Melle/Mr. BEN YAOU Akli est accepté en tant qu'une **communication par affiche** durant les JIB2015 qui auront lieu à Djerba du 20 au 24 Décembre 2015. Afin de confirmer votre participation, prière de s'inscrire via le site web : <http://www.atbiotech.org/> avant le 15 Novembre 2015.

En cas de non confirmation dans les délais, votre participation sera automatiquement rejetée.

الجمعية التونسية
للتقانات الحيوية
A.T. BIOTECH.
Téléfax : 74 870 692

S. Bejar

Le comité d'organisation
Prof. Samir BEJAR



***The 1st International Conference
Microbial Ecology: Towards New Challenges
Sétif-Algeria, December 12th - 14th, 2015***

Sétif, November 4th 2015

Certificate of Acceptance

Dear Ben Yaou Akli

We hereby acknowledge reception of your abstract entitled: **ISOLATION OF BIOACTIVE ACTINOMYCETES FROM SOIL SAMPLES COLLECTED IN WATER SOURCE IN THE REGION OF TIZI-OUZOU, NORTH ALGERIA**, that you wish to present at the 1st International Conference of Microbial Ecology (ICMES 2015), that will be held in December 12th - 14th, 2015 at Sétif-Algeria. We have read it and we officially state it is accepted for presentation as a Poster.

We look forward to see you in Sétif

On behalf of the organizing committee

Allaoua SILINI



Résumé

La biodiversité microbienne au niveau de niches écologiques diverses constitue un réservoir encore sous-exploité aux potentialités prometteuses dans le domaine des biotechnologies. L'exploration et la valorisation de cette biodiversité revêt donc une importance capitale, notamment dans la recherche d'outils thérapeutiques pouvant répondre à des problématiques de santé publique majeures telle que l'émergence et la propagation des bactéries multi-résistantes. Dans le cadre d'une étude visant à isoler des souches d'actinomycètes productrices, éventuellement, de nouvelles molécules antibactériennes, dix échantillons de sol ont été collectés aux abords d'une source d'eau située dans la commune de Ain El Hammam au Sud-Est de la wilaya de Tizi-Ouzou (Nord de l'Algérie). Un total de 27 souches ont été isolées dont l'activité antibactérienne a été testée sur des souches de référence (*Escherichia coli*, ATCC 25922 ; *Pseudomonas aeruginosa*, ATCC 27853 et *Staphylococcus aureus*, ATCC 25923) par deux méthodes de diffusion sur agar : la technique des stries perpendiculaires et la technique des cylindres d'agar. Sur 27 isolats, 18 ont montré une activité vis-à-vis d'au moins une bactérie test, parmi lesquels 13 sont hautement actifs contre *Staphylococcus aureus* avec des diamètres d'inhibition entre 20 et 27 mm, 4 présentant une activité contre les 3 bactéries test et un isolat particulièrement actif contre *Pseudomonas aeruginosa* avec un diamètre d'inhibition de 30 mm. Cinq isolats des plus actifs ont été sélectionnés pour identification. Les résultats obtenus attestent de la grande richesse de cette région en termes de souches microbiennes d'intérêt biotechnologique et se révèlent également prometteurs quant à d'éventuelle application contre des bactéries multi-résistantes.

Mots clés : Biodiversité ; Actinomycètes ; Activité antibactérienne ; Molécules bioactives; Bactéries multi-résistantes.

Abstract

Microbial biodiversity in various ecological niches is a reservoir still under-exploited with promising potential in the field of biotechnology. The exploration and exploitation of this biodiversity is therefore of vital importance, particularly in finding therapeutic tools that can respond to major public health issues such as the emergence and spread of multi-resistant bacteria. As part of a study to isolate strains of actinomycetes producing potentially novel antibacterial molecules, ten soil samples were collected near a water source located in the locality of Ain El Hammam South-East of Tizi-Ouzou district (North Algeria). A total of 27 strains were isolated and screened for antibacterial activity against three reference strains (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) by two agar diffusion methods: the perpendicular streak method and the agar cylinder method. Of 27 isolates, 18 showed an activity toward at least one test bacterium, of which 13 are highly active against *Staphylococcus aureus* with inhibition diameters between 20 and 27 mm, 4 having an activity against 3 test bacteria and a particularly active one against *Pseudomonas aeruginosa* with a 30 mm inhibition diameter. Five isolates of the most active were selected for identification. The results attest of the wealth of this region in terms of microbial strains of biotechnological interest and seem to be promising for possible applications against multi-resistant bacteria.

Key words: Biodiversity; Actinomycetes; Antibacterial activity; Bioactive compounds; Multiresistant bacteria.