



DEPARTEMENT DE SCIENCES BIOLOGIQUES

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN SCIENCES BIOLOGIQUES

Spécialité : BIOCHIMIE APPLIQUEE

Présenté par

Melle Amara Souhila et Mr Boukhoursa Abd-El-karim

THÈME

Isolement et caractérisation des Actinomycètes productrices des antibiotiques et des lipides, et mise en évidence de leurs pouvoirs antibactériens vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*

Soutenue publiquement le 11 /07/2019

DEVANT LE JURY

Président	: Mme W. SIDHOM	Grade : MCB	U. Mostaganem
Encadreur	: Mlle F. TISSOURAS	Grade : MCA	U. Mostaganem
Examinatrice	: Mme k. ZERROUKI	Grade : MAA	U. Mostaganem

Année universitaire 2018-2019

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier « Allah » qui nous a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

*Les travaux présentés dans ce Mémoire ont été effectués au Laboratoires de Biochimie 1, 2 et 3 du département de Biologie, Sous la direction de Mlle **F. Tissouras** Enseignante et Maître de conférences à la faculté SNV université de Mostaganem. Nous tenons à exprimé nos très sincères remercier d'avoir proposé le thème et accepté la responsabilité de nous encadré malgré ses nombreuses obligations. Nous tenons vivement à lui exprimer nos profondes reconnaissances et*

*Nous tenons à remercier Moadame **W. Sidhoum** Maître de conférences et enseignant au département des sciences biologiques à l'université de Mostaganem, d'avoir accepté de présider le jury.*

*Je tiens également à témoigner ma gratitude à Madame **K. ZARROUKI** maître-assistant et enseignant au département des sciences biologiques à l'université de Mostaganem, d'avoir acceptée d'examiné le travail.*

*Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur **R. Djibaoui** pour sa contribution dans la confirmation des souches.*

Un grand merci aux enseignants Mr S. Nebbache, Mr M. Tahri et tous enseignants du département de biologie les ingénieurs des laboratoires de Microbiologie et de Biochimie et la salle de stérilisation.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail qui est le fruit de mes efforts

A ceux que j'aime le plus au monde mes très chers parents, leurs sacrifices et leurs encouragements toute ma vie.

Mes chères sœurs : Hadjira , Fatima zouhra et Ahlem

A toute ma famille, oncles et tantes, cousins et cousines, petit et grand, sans exception.

Toutes mes chères amies : Asmaa, Louiza, Nesrine, Amina, Ouassila, Ahlem.

*Tous les enseignants de département "biologie "
spécialement: Mr. Dahmouni*

*A tous mes amis, et toute personne que je connais, a toute la promotion Master II Biochimie Appliquée
2018/2019.*

Souhila.

Remerciements

*Nous remercions Dieu tout puissant de nous avoir donné le courage et la patience
pour réaliser ce modeste travail.*

Recevez ici nos sincères remerciements pour la confiance, les conseils que vous nous
avez accordés tout le long de ce travail. Merci pour votre encadrement, votre
disponibilité, Melle **F. Tissouras**.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur **R. Djibaoui** d'avoir accepté de
présider le jury.

L'honneur qu'ils nous ont fait en acceptant d'examiner ce travail.

Un grand merci à tous les ingénieurs des laboratoires de Microbiologie et de
Biochimie.

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à :

ALLAH le tout puissant à qui je dois tout.

*Les personnes, les plus chères au monde que
je ne remercierais jamais assez : leur aides, l'encouragement,
Soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie :
mes chères parents, Mes chères frères, Mes chères sœurs.*

*Toutes mes chères amies :! Hammou, Charef, Mohammed,
Abdellah, Fátima et Hakima, Habib,*

Sans oublier toute la famille de près ou de loin

*Mes chères amis de la promotion de master de parcours
biochimie appliqué en témoignage de l'amitié qui nous unit
et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés
ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de
bonheur. Tous les étudiants, enseignants et personnels du
département des Sciences Biologique.*

Abdelkrím

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ARNr 16S: acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S.

ARNr : Acide ribonucléique messenger

ATB: Antibiotique

CG : Guanine Cytosine.

CMB : Chromatographie Couche Mince.

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice.

CPG chromatographie en phase gazeuse

DHF: acide dihydrofolique

DMSO: Dimethylsulfoxyde

DO: densité optique

H₂O₂ : Peroxyde d'hydrogène

H₂S : Sulfure d'hydrogène

H₂SO₄ : Acide sulfurique

HPLC: Chromatographie Liquide à Haute Performance (« High Performance LiquidChromatography »)

ISP: International *Streptomyces* Project

M : Molaire

MA : Mycélium aérien.

MS : Mycélium du substrat.

NaCl : Chlorure de Sodium.

NO₂ : dioxyde d'azote

P/V : Poids/Volume

PLP : Phosphate de pyridoxal

RFLP : Polymorphisme de longueur des fragments de restriction (restriction fragment lengthpolymorphism)

RM : Rouge de Méthyle

THFA : acide tétrahydrofolique

TSI : Triple SugarIron

UFC : Unité Formant Colonie

UV-visible : ultra violet

VP : Vosges-Proskauer

Liste des tableaux

Tableaux	Titres	Pages
Tab. 1	CG% de quelques genres d'actinomycètes (Larpen et Sanglier, 1989)	2
Tab. 2	Habitats de certains actinomycètes (Grigorova et Norris, 1990).	9
Tab. 3	Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol (Andriambololona, 2010).	9
Tab. 4	Les différentes méthodes moléculaires d'identification des <i>Streptomyces</i> (Anderson et Wellington, 2001).	13
Tab. 5	Liste de quelques antibiotiques synthétisés par les variations de <i>Streptomyces</i>	15
Tab. 6	Quelques herbicides produits par des <i>Streptomyces</i> .	15
Tab. 7	Liste de quelques enzymes synthétisés par diverses <i>Streptomyces</i> et leur application industrielle	16
Tab. 8	Classification des β -lactamines selon la structure (Archambaud, 2009)	18
Tab. 8	La classification des quinolones selon certains auteurs.	18
Tab. 9	Principaux antibiotiques classés selon leur site d'action (Figarella et al., 2007).	21
Tab. 10	Les références de deux souches testées	24
Tab. 11	Taxonomie de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Chaker H, 2012).	25
Tab. 12	Taxonomie de <i>Bacillus subtilis</i> (Delerras, 2007).	26
Tab. 13	Séries des dilutions des deux extraits aqueux et organiques.	36
Tab. 14	Aspect macroscopique des souches actinomycètes sur le milieu caséine amidon.	38
Tab. 15	Caractéristiques physiologiques et biochimiques des quatre souches.	41
Tab. 16	Résultats d'utilisation des différents substrats carbonés et production de H ₂ S.	46
Tab. 17	Moyennes de diamètres des zones d'inhibitions (en cm) des extraits d'ATB de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>B. subtilis</i>	50
Tab. 18	Moyennes de diamètres des zones d'inhibitions (en cm) des extraits huileux de <i>Streptomyces</i> vis-à-vis de <i>P. aeruginosa</i> et <i>B. subtilis</i>	51

Liste des figures

Figures	Titres	Pages
Fig. 1	Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).	3
Fig. 2	Vue au microscope électronique à balayage des types mycélium des actinomycètes.	4
Fig. 3	Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Messaoudiet al., 2019).	4
Fig. 4	Diversité des types de surface de spores chez le genre <i>Streptomyces</i> ¹	5
Fig. 5	Différents sporanges d'actinomycètes (Belyagoubi, 2013).	6
Fig. 6	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu-vert) et mort (blanc) (Prescott et al., 2003).	7
Fig. 7	Origine des antibiotiques (Berdy, 2005).	10
Fig. 8	Classification du genre <i>Streptomyces</i> selon Bergy's, (2006) .	11
Fig. 9	Cycle de vie des <i>Streptomyces</i> (Scherr et Nguyen, 2009 ; Delaunay et al., 2003)	14
Fig. 10	Les structures chimiques des cinq grandes familles des antibiotiques (Prescott et al. 2007).	18
Fig. 11	Mécanisme d'action des principaux antibiotiques (Madiganet al., 2012).	20
Fig. 12	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> vue au microscope électronique ³	25
Fig. 13	<i>B. subtilis</i> observé en microscopie électronique	26
Fig. 14	Les différentes étapes du protocole expérimental.	27
Fig. 15	Site des prélèvements des échantillons région Abdelmalek Ramdane (Ouillis) de la wilaya de Mostaganem (photo prise le 10/02/2019).	28
Fig. 16	Présentation des différentes dilutions de suspensions du sol.	29
Fig. 17	Protocole d'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures	35
Fig. 18	Présentation d'une boîte de Pétri avec les disques chargés des extraits.	37
Fig. 19	Les souches d'actinomycètes isolés sur milieu amidon-caséine	38
Fig. 20	Observation des pigmentations des (substrat et aérien) des isolats d'actinobactéries.	39
Fig. 21	Observation du mycélium aérien des s'isolat au microscope optique G (x100).	40
Fig. 22	Test positif d'hydrolyse de l'amidon pour des quatre isolats des <i>Streptomyces sp.</i>	42
Fig. 23	Test positif d'hydrolyse de la gélatine pour les quatre isolats des <i>Streptomyces sp.</i>	42
Fig. 24	Test positif d'hydrolyse de la caséine pour les quatre isolats des <i>Streptomyces sp.</i>	43
Fig. 25	Tests de nitrate pour les quatre isolats des <i>Streptomyces sp.</i>	43
Fig. 26	Test positif avec tous les isolats.	44
Fig. 27	Test de l'activité lécithinolytique des quatre isolats des <i>Streptomyces sp</i>	44
Fig. 28	Résultats du test de l'urée des quatre isolats des <i>Streptomyces sp</i>	45
Fig. 29	Présentation de résultat de citrate des quatre isolats des <i>Streptomyces sp</i>	45
Fig. 30	Présentation le résultat des réactions VP et RM des quatre isolats des <i>Streptomyces sp</i>	46
Fig. 31	Le test de l'activité de fermentation des sucres et production de H ₂ S des quatre	47

souches *Streptomyces sp.*

Fig. 32	Les rendements moyens en poids des ATB des isolats de <i>Streptomyces sp</i>	48
Fig. 33	Extrait aqueux en ATB produit par la souche A3.	48
Fig. 34	Les rendements moyens en poids des huiles brutes des isolats de <i>Streptomyces sp</i>	49
Fig. 35	Couleur des huiles brutes de <i>Strptomyces sp.</i>	49
Fig. 36	Tests d'antibiogramme des extraits d'ATB.	51
Fig. 37	Tests d'antibiogramme des extraits Huileuse.	53

Table de matière

Parité bibliographique

Introduction	1
Chapitre I : Présentation des actinomycètes et des Streptomycètes	
1. Généralités les actinomycètes.....	2
1.1 Classification.....	2
1.2 Morphologie	3
1.3 Physiologie des actinomycètes	7
1.3.1 Oxygène.....	7
1.3.2 pH.....	7
1.3.3 Température.....	7
1.3.4 Activité de l'eau	8
1.3.5 Tolérance en NaCl.....	8
1.4 Métabolites des actinomycètes	8
1.5 Écologie des actinomycètes.....	8
1.6 Importance des actinomycètes.....	10
2. Le genre <i>Streptomyces</i>	11
2.1 Généralités sur le genre <i>Streptomyces</i>	11
2.2 Classification du genre <i>Streptomyces</i>	11
2.3 Taxonomie des Streptomycètes	12
2.4 Taxonomie phénotypique	12
2.4.1 Taxonomie numérique.....	13
2.4.2 Chemotaxonomie.....	13
2.4.3 Taxonomie Génétique.....	13
2.5 Cycle de développement des <i>Streptomyces</i>	13
2.6 Applications des <i>Streptomycètes</i>	15
2.6.1 Dans le domaine pharmaceutique.....	15
2.6.2 Bioherbicides	15
2.6.3 En biotechnologie.....	16
Chapitre II : Généralités sur les antibiotiques	
1. Définition des antibiotiques.....	17
2. Origine des antibiotiques.....	17
3. Classification des antibiotiques	17
4. Mode d'action des antibiotiques.....	19
4.1. La paroi.....	19
4.2. La membrane cytoplasmique.....	20

4.3.	Le chromosome	21
4.4.	Le ribosome	21
5.	Résistance bactérienne aux antibiotiques	21
5.1.	La résistance naturelle	21
5.2.	La résistance acquise	22
6.	Importants mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques	22
6.1.	Inactivation enzymatique de l'antibiotique	22
6.2.	Modification de la cible	22
6.3.	Mécanisme d'efflux	22
6.4.	Diminution de la perméabilité membranaire (absence de pénétration)	23

Chapitre III : Présentation des souches *P. aeruginosa* et *B. subtilis*

1.	Définition de la substance antimicrobienne	24
2.	Les souches bactériennes testées	24
2.1	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
2.1.1	Caractéristiques générales	24
2.1.2	Taxonomie	25
2.2	<i>Bacillus subtilis</i>	25
2.2.1	Caractéristiques générales du genre	25
2.2.2	Taxonomies	26

Parité expérimentale

Chapitre IV : matériel et méthode

1	L'objectif global	27
2	Protocole expérimental général	27
3	Site des prélèvements des échantillons	28
4	Isolement et purification des actinomycètes (<i>Streptomyète</i>)	29
4.1	Préparation des suspensions du sol	29
4.2	Ensemencement des suspensions de sol	29
4.3	Purification et conservation des isolats	29
5	Caractérisation des Actinobactéries	30
5.1	Caractérisation macroscopique	30
5.2	Caractérisation microscopique	30
5.3	Caractérisation physiologique et biochimique	30
5.3.1	L'hydrolyse de l'amidon	31
5.3.2	La dégradation de l'urée	31
5.3.3	L'utilisation de citrate	31
5.3.4	Les réactions VP et RM	31
5.3.5	La réduction de nitrate réductase	32

5.3.6	La fermentation du glucose, lactose, saccharose et la production de H ₂ S:	32
5.3.7	La catalase	32
5.3.8	Hydrolyse de la gélatine	32
5.3.9	Recherche d'une caséinase	33
5.3.10	Recherche d'une lécithinase	33
6	Production d'antibiotique et d'huile sur un milieu liquide	33
6.1	Préparation des cultures (inoculum)	33
6.2	Fermentation submergé de l'inoculum	33
6.3	Extraction des ATB et des huiles brutes.....	33
7	Tests de diffusion en milieu solide de l'antibiotique.....	36
7.1	Préparation de l'inoculum des souches pathogène	36
7.2	Préparation des dilutions des extraits organiques.....	36
7.3	L'antibiogramme	36

Chapitre V : Résultats et Discussion

1.	Isolement des actinobactéries	38
2.	Caractérisation macroscopiques	38
3.	Caractérisation microscopiques.....	39
4.	Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques	41
4.1	Hydrolyse de l'amidon	41
4.2	Hydrolyse de la gélatine	42
4.3	Hydrolyse de la caséine	43
4.4	Réduction de nitrate.....	43
4.5	Recherche de Catalase.....	44
4.6	Hydrolyse de lécithine.....	44
4.7	Dégradation de l'urée.....	44
4.8	L'utilisation de citrate.....	45
4.9	Les réactions VP et RM.....	45
4.10	Utilisation des différents substrats carbonés et production de H ₂ S	46
5.	Fermentation submergée	47
6.	Les rendements des extractions d'ATB et de l'huile.....	48
6.1	Les rendements des extractions d'ATB.....	48
6.2	Les rendements de l'huile.....	48
7.	Test antibiogramme des deux extraits (ATB et l'huile)	50
Conclusion et perspectives		54
Référence		55

Résumé

Introduction

Introduction

Actuellement, les recherches sont concentrées sur les métabolites à effet antimicrobien d'origines différentes végétales, animales, fongiques ou bactériennes. Ces métabolites secondaires ou primaires sont une source importante des substances ayant des activités biologiques puissantes. Parmi, ces métabolites sur les antibiotiques d'origines bactériens et fongiques du sol. Cependant, les actinomycètes considérés comme une principale source des molécules biactives, ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire d'environ 70% des antibiotiques. Leurs effets antimicrobiens sont les plus puissants contre les mycètes et les bactéries pathogènes (**Okami et Hotta, 1988**). Les principaux antibiotiques sécrétés par les actinomycètes sont : la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines.

Le présent travail est focalisé dans ce contexte, et il est structuré en deux parties.

La première regroupe la synthèse des données bibliographiques qui sont répartir en trois chapitres. Le premier présente une description générale des actinomycètes de sol, suivie d'une présentation des métabolites secondaire (antibiotiques), et les souches testés (*Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*). La seconde partie expérimentale présente la méthodologie suivie durant la réalisation de ce travail. Elle est basé sur :

- L'isolement et la purification des souches d'actinomycètes à partir des échantillons de sols foresterie localisé dans la région d'Abdelmalek Ramdane (Ouillis) de la wilaya de Mostaganem ;
- L'utilisation des isolats d'actinomycètes dans la production d'antibiotiques et des huiles sur milieu liquide ;
- La mise en évidence de l'activité antibactérienne des deux extraits des différentes souches sélectionnées.

En dernier, les résultats sont présentés la discussion avec une conclusion et perspectives.

Partie bibliographique

Chapitre I :

Présentation des actinomycètes et des Streptomycètes

I. Présentation des actinomycètes et des *Streptomyces*

1. Généralités les actinomycètes

Ils ont été observés pour la première fois en 1879 dans l'eau. Cependant vers 1898 les premiers actinomycètes thermophiles ont été décrits, comme étant des microorganismes intermédiaires entre le règne des champignons et celui des bactéries (**Isabelle H, 1999**). Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses et ramifiées, ils forment des colonies circulaires constituées d'hyphes ramifiés, et non fragmentés. Sous forme de filaments qui irradient par croissance centrifuge, autour de leurs germes. Cela explique leur nomination qui provient de deux mots grecs «aktino», signifie champignons ou « champignons rayonnant» et «mycetes» rayons. Ce sont des bactéries aérobies à Gram positif, ayant la capacité de former des spores **asexuées** (conidiospores ou sporangiospores) (**Waksman et Henrici 1943 ; Kutzner 1981 ; Larpent et Sanglier 1989 ; Holt et al., 1994**).

1.1 Classification

Les actinomycètes appartiennent à la classe des *Actinobacteria*, à Gram positif de haut coefficient de Chargaff (% GC) compris entre 60 et 75 % (**tab.1**).

Tab. 1 : CG% de quelques genres d'actinomycètes (**Larpent et Sanglier, 1989**).

Genre	G+C%
<i>Mycobactéries</i>	64-70
<i>Actinomycètes</i>	63-73
<i>Nocardia</i>	67-69.4
<i>Streptomyces</i>	69-76
<i>Micromonospora</i>	71.4-72
<i>Actinoplanes</i>	70.6-76

Les actinomycètes appartiennent au règne des procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Actinobacteria, contenant l'ordre des Actinomycetales (**Larpent, 2000**). Cet ordre est subdivisé en 13 sous-ordres et 42 familles (**fig. 1**).

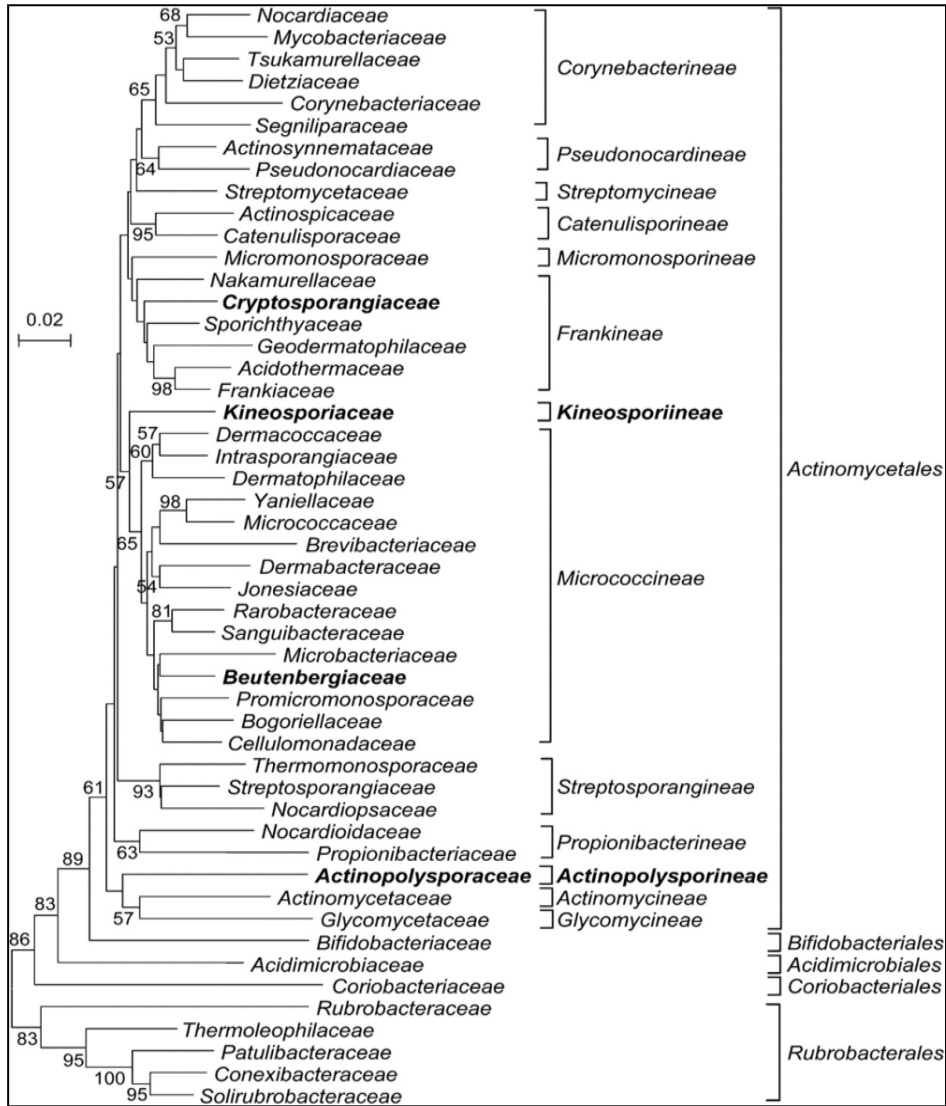


Fig. 1: Classification phylogénétique des *Actinobacteria*, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).

1.2 Morphologie

D'après Prescott *et al.* (1997), les actinomycètes présentent un aspect morphologie qui ressemble aux mycètes. À l'exception, le diamètre des hyphes est de 0,5 à 1 µm (Eunice, 1983), il est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 µm) (Gottlieb, 1973). Toutefois, une grande diversité morphologies de mycélium existe, on remarque :

- ❖ Des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*) ;
- ❖ Des espèces au mycélium provisoire, qui se fragmente (certaines *Nocardia*) (fig. 2) ;
- ❖ Des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces* (fig. 2).

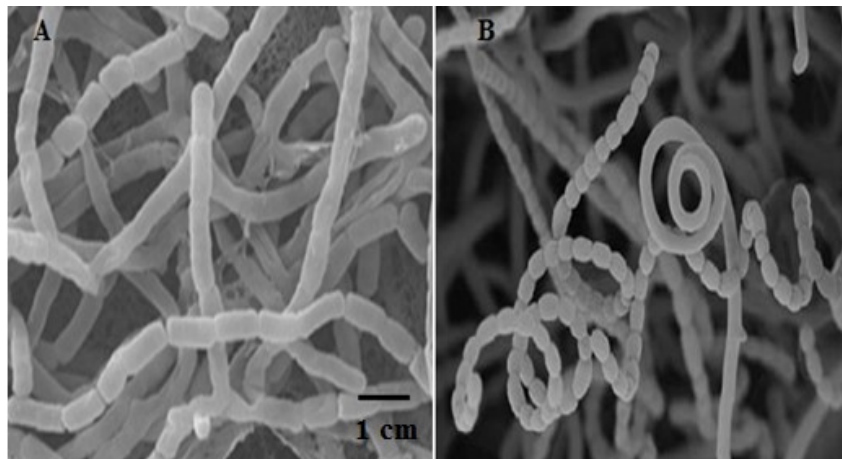


Fig. 2 : Vue au microscope électronique à balayage des types mycélium des actinomycètes.
(Gottlieb, 1973).

(A) Mycélium du genre *Nocardia* fragmenté,

(B) Mycélium du genre *Streptomyces* en sporulation.

L'analyse des hyphes des actinomycètes révèle la présence de deux catégories de filaments. Des filaments pellets sont des agrégats de plusieurs hyphes enchevêtrés, leurs diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres. Des hyphes divisés en deux formes «mycélium dispersé «freely dispersed» et mycélium agrégé «freely clumps» (fig. 3).

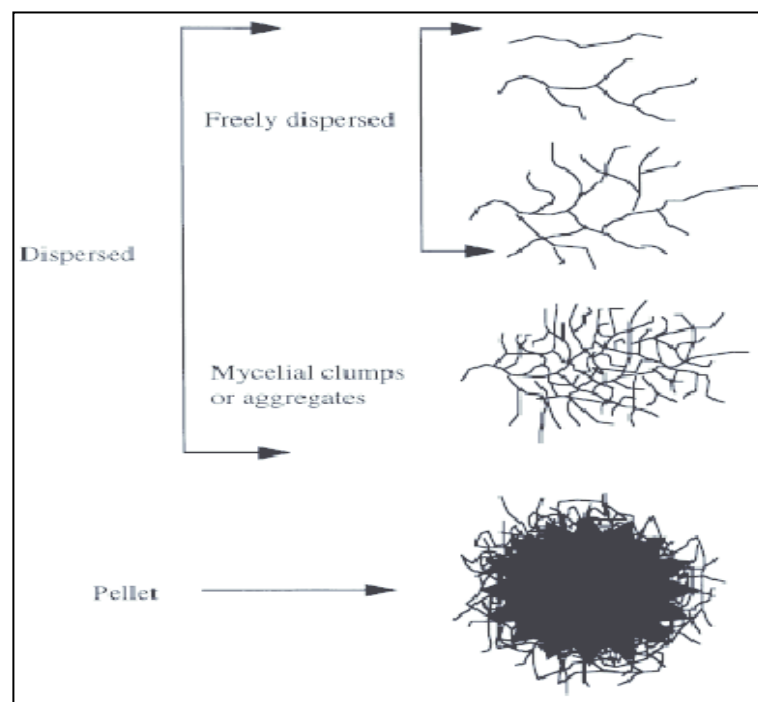


Fig.3. Morphologie des hyphes en croissance dans le milieu liquide (Messaoudi *et al.*, 2016).

Selon les genres actinomycètes, les filaments mycéliens peuvent produire des différents types de spores, des spores produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînes (*Streptomyces*). Les chaînes de spores

peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (Belyagoubi, 2014).

Les différents genres d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridée avec piquants ou d'aspect velu (fig. 4). Aux conditions hostiles les hyphes deviennent résistants, soit en produisant des endospores comme les *Thermoactinomyces* qui sont hautement résistantes à la chaleur. Ces endospores sont semblables à celles des *Bacillus* (Kalakoutsii et Agre, 1976). Les conidies sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations (Zermane, 2007 ; Belyagoubi, 2014):

- ❖ Une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
- ❖ Une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
- ❖ Chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- ❖ Longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
- ❖ conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées).

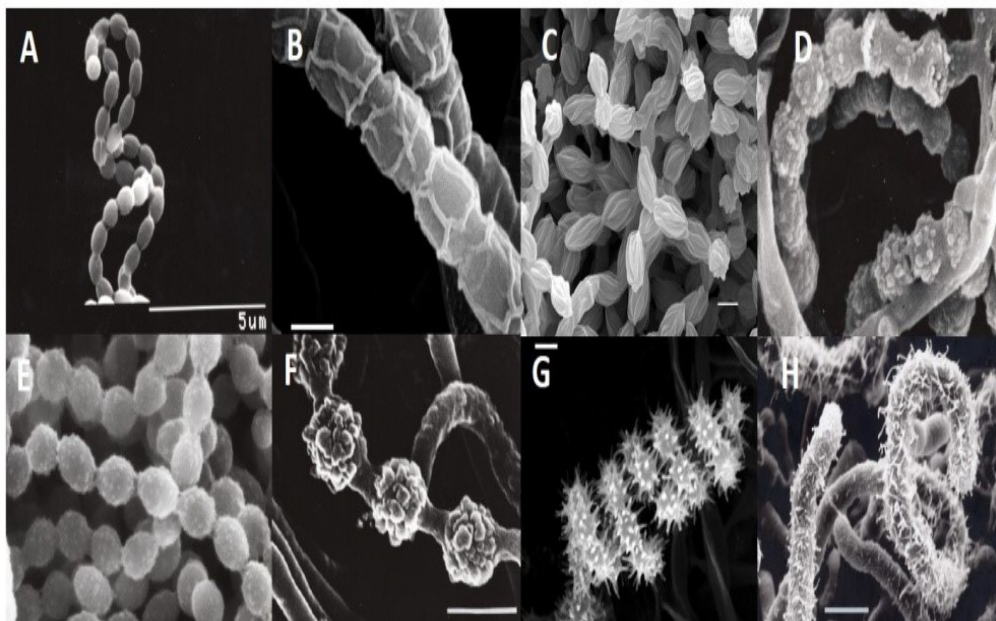


Fig. 4 : Diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces*(1).

(A) *Streptomyces otagonensis* SANK 62589. (B) *Streptomyces sp.* OM-6519. (C) *Actinomadura rugatobispora* AS 6321. (D) *Actinomadura sp.* ATCC 53676. (E) *Streptomyces routienii* ATCC 39466. (F) *Actinomadura verrucosospora* JCM 3147. (G) *Streptomyces sp.* WK-1875. (H) *Streptomyces finlayi* JCM 4637

La plupart des actinomycètes sont immobiles. D'autres genres d'actinomycètes sporulent en produisant des sporanges, compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (fig. 5) (Belyagoubi, 2014 ; Kalakoutskaa et Agre, 1976).

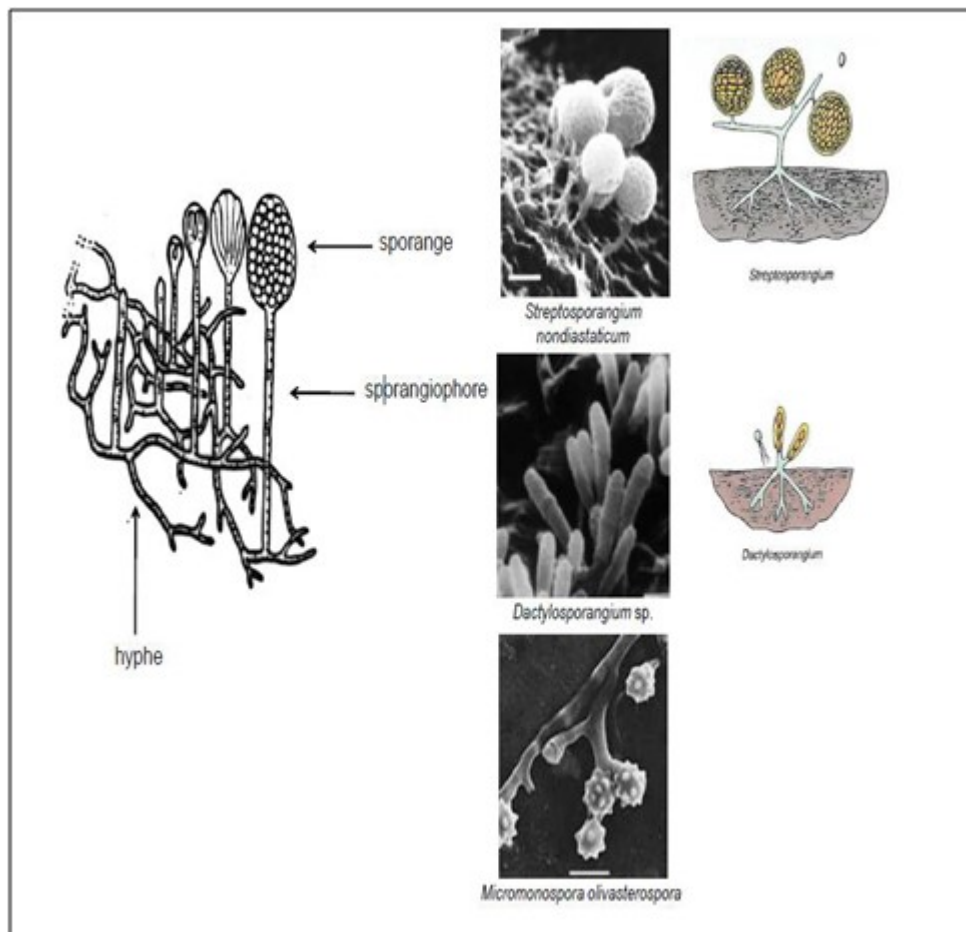


Fig. 5 : Différents sporanges d'actinomycètes (Belyagoubi, 2014).

Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat ou mycélium de base) et/ou en mycélium aérien (fig. 6) (Djaballah , 2010). On distingue trois cas :

- Soit le mycélium végétatif est formé seul, où la croissance a lieu dans ou à la surface du milieu. Le mycélium est coénocytique : il renferme un cytoplasme commun multi-nucléoïde, et dépourvu de septum (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*).
- Soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûré en conidies, ce mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat (exemple : *Streptomyces*).
- Soit, le mycélium aérien est formé seul, dont les hyphes de ce mycélium sont attachées au substrat par des crampons (exemple : *Sporichthya*).

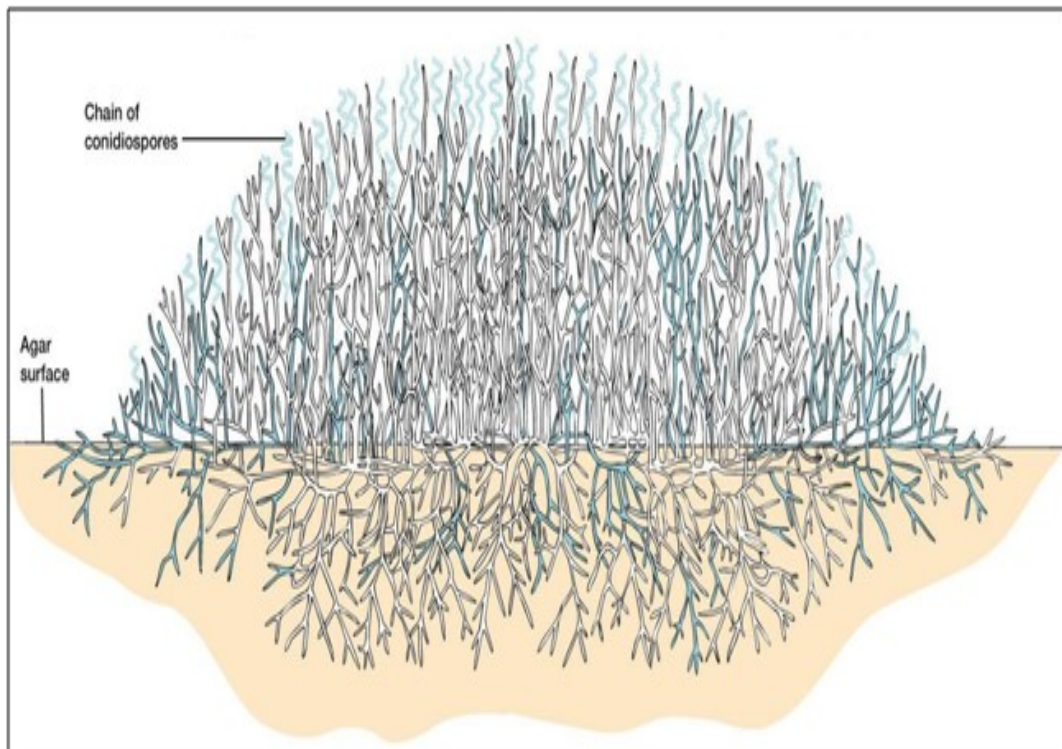


Fig. 6 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes avec des hyphes vivants (bleu-vert) et mort (blanc) (**Prescott *et al.*, 2003**).

1.3 Physiologie des actinomycètes

La croissance des actinomycètes est influencée par plusieurs paramètres physiologiques :

1.3.1 Oxygène

On peut diviser les actinomycètes en deux groupes selon leurs types respiratoires :

- Les formes fermentatives anaérobies strictes ou facultatives, représentées par le genre *actinomyces*, ils sont commensales obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs.
- Les formes oxydatives aérobies, telles que les *Streptomyces*, sont abondantes dans la nature en particulier sur le sol (**Avril *et al.*, 1992**).

1.3.2 pH

La plupart des actinomycètes se comportent comme des bactéries neutrophiles. Leur croissance est optimale à un pH compris entre 7 et 8. D'après **McKinney (2004)**, ils peuvent tolérer un pH acide inférieurs à 4.

1.3.3 Température

La température optimale des actinomycètes mésophiles est situé entre 25 et 30 C°. Selon **Holt *et al.* (1994)**, il existe des espèces thermophiles et même psychrophiles dans le genre

Thermoactinomyces dont la température optimale peut atteindre 60°C, comme *Streptomyces thermocrophilus* (Kim et al., 2000 ; Rangaswami et al., 2004).

1.3.4 Activité de l'eau

Généralement, les actinomycètes ont été isolés à partir des sols à des taux faible jusqu'à modérés d'humidité, ce qui permet de dire qu'ils ne sont pas trop influencés par les conditions semi-arides (Oskay et al., 2004 ; Prescott et al., 2007). L'activité d'eau optimale pour leur croissance et leur développement est d'environ 0,98 (Zvyagintsev et al., 2005).

1.3.5 Tolérance en NaCl

Le NaCl est nécessaire pour la croissance les actinomycètes comme tous les microorganismes, selon leurs exigences en NaCl, ils sont divisés en deux groupes (Messaoudi, 2012) :

- **Les halophiles** : Les faiblement halophiles, la concentration varie de 1-6 %, pour les bactéries extrêmes halophiles les taux peuvent atteindre jusqu'aux 15 à 30 %.
- **Les halotolérants** : On distingue, les légèrement tolérants de 6 à 8 % de NaCl; les modérément tolérants de 18 à 20 %; et les extrêmement tolérants se développe de 0 % jusqu'à saturation en NaCl. Cette tolérance n'est obligatoire pour leurs croissances.

1.4 Métabolites des actinomycètes

Les actinomycètes ont des métabolites primaires qui s'impliquent dans l'activité biologique et la formation structurelle de la cellule. Les actinomycètes présentent une capacité à produire divers métabolites secondaires qui ont des activités biologiques très diverses telles que : antifongiques, antitumorales, antibactériennes, immunosuppressives, insecticides et inhibitrices d'enzymes (Theilleux, 1993 ; Ginolhac, 2006 ; Solanki et al., 2008).

1.5 Écologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires, on les rencontre sur tous les substrats naturels. La grande majorité est d'origine tellurique 10 à 20% ou même plus (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Ishizawa et Araragi, 1976 ; Larpent et Sanglier, 1989). Ils sont généralement saprophytes (genre *Frankia*). Les actinomycètes peuvent vivre à l'état libre ou en association, les associations établies sont ; la symbiose avec les plantes non légumineuses comme le genre *Frankia* (fixation de l'azote atmosphérique) ou l'endophytisme dans les tissus de plantes où il stimulent leur croissance ou même dans les invertébrés marins (tab. 2) (Bradbury, 1986; Benson et Silvester, 1993 ; Doumbou et al., 1998 ; Salomon et al., 2004 ; Verma et al., 2009).

Tableau 2 : Habitats de certains actinomycètes (Grigorova et Norris, 1990).

Actinomycètes	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	L'eau douce, la litière végétale, le sol.
<i>Frankia</i>	
<i>Micromonospora</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses.
<i>Nocardia amarae</i>	
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	L'eau douce, les sédiments, les sols humides.
<i>Saccharopolyspora</i>	Les boues activées.
<i>rectivirgula</i>	Les déjections animales, l'eau, le sol.
<i>Streptomyces</i>	Moisi du foin.
<i>Thermoactinomyces</i>	Le sol, la litière végétale, l'eau. Le compost.

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols, ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol (la rhizosphère) jusqu'au 2 m de profondeur. Le genre *Streptomyces* est le plus fréquent dans le sol, il présente à lui seul 95% des souches d'Actinomycètes isolées (**tab. 03**) (Nonomura, 1969).

Tab. 3 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol (Andriambololona, 2010).

Genre	Pourcentage (%)
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporagium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Microspolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

1.6 Importance des actinomycètes

Les Actinomycètes sont les plus productifs d'antibiotiques de tous les micro-organismes. On estime que les deux tiers des six mille antibiotiques isolés jusqu'à présent sont produits par les actinomycètes. Toutefois, les premiers qui ont démontré la richesse des actinomycètes dans ce domaine c'est Waksman et Henrici. Ces chercheurs ont isolés dans les années 1940, 1944, 1949 et 1953 quatre premiers antibiotiques respectivement l'actinomycine antitumorale; la streptomycine antibactérienne y compris antituberculeuse; la néomycine antibactérienne; et la candidicine antifongique, ayant aussi des propriétés pharmacologiques intéressantes (ligand des stérols). Les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques sont cités et détaillé ultérieurement dans le chapitre II.

Malgré les progrès de synthèses chimiques des antibiotiques, en effet, 45% sont connus naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces* (fig. 7) (Sibanda *et al.*, 2010).

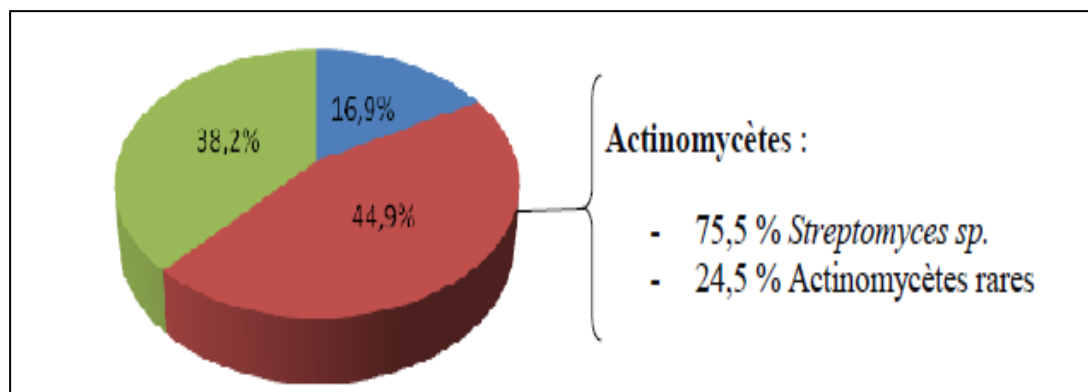


Fig. 7 : Origine des antibiotiques (Berdy's, 2005).

- Produits issus de bactéries non actinomycétales,
- Bactéries actinomycétales,
- Champignons microscopiques

Cependant, les plus importants produits des actinomycètes après les antibiotiques sont les enzymes. Certaines, comme les isomérases du glucose et les protéases sont utilisées dans les industries alimentaires et des détergents. Les glycosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales comme les amylases et les xylanases, ainsi que, dans la biomasse animales telles que les chitinases (lechevalier, 1981).

2. Le genre *Streptomyces* .

2.1 Généralités sur le genre *Streptomyces*.

Le genre *Streptomyces* représentent le groupe majoritaire des *Actinomycetales* (95,34%). Il s'agit de bactéries Gram positif, filamenteuses de longueurs variables des hyphes, et des diamètres compris entre 0,5 et 2,0 μm . Quelques espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux et on trouve d'autres qui sont phyto-pathogènes (**Saffroy, 2006**). On estime qu'un gramme de sol contient 10^9 UFC des actinomycètes dont 10^7 UFC *Streptomyces* (**Baltz, 2007**). Les espèces sont chimio-organo-trophiques, des bactéries aérobies, non acides, rapides avec une teneur élevée en GC de plus de 70%. Ils se présentent dans les mêmes habitats que les champignons et sont superficiellement similaires. Les spores sont très petits, généralement de 1 μm ou moins de diamètre, les spores sont formées par la fragmentation des filaments et sont portées par des spores droites, ondulées ou hélicoïdales (**Amin H et al., 2014**).

2.2 Classification du genre *Streptomyces*

Il est le plus grand genre *d'Actinobactéries* de la famille *Streptomycetaceae*. Le genre *Streptomyces* a été proposé par Waksman et Henrici (1943) et classé sur la base de la morphologie et de la composition de la paroi cellulaire. Les streptomycètes possèdent un génome à haute teneur en GC. Certains taxonomistes ont estimé que la capacité de nombreuses espèces de *Streptomyces* à produire des substances antimicrobiennes était l'un des critères importants de la différenciation des espèces. Plus de 500 espèces et sous-espèces de *Streptomyces* ont été décrites, soit le plus grand nombre de genres bactériens (**Noura et al., 2011**). Le genre appartient à l'ordre des *Streptomycetales*, la figure ci-dessous représente la classification du genre *Streptomyces* selon Bergy's Manual.

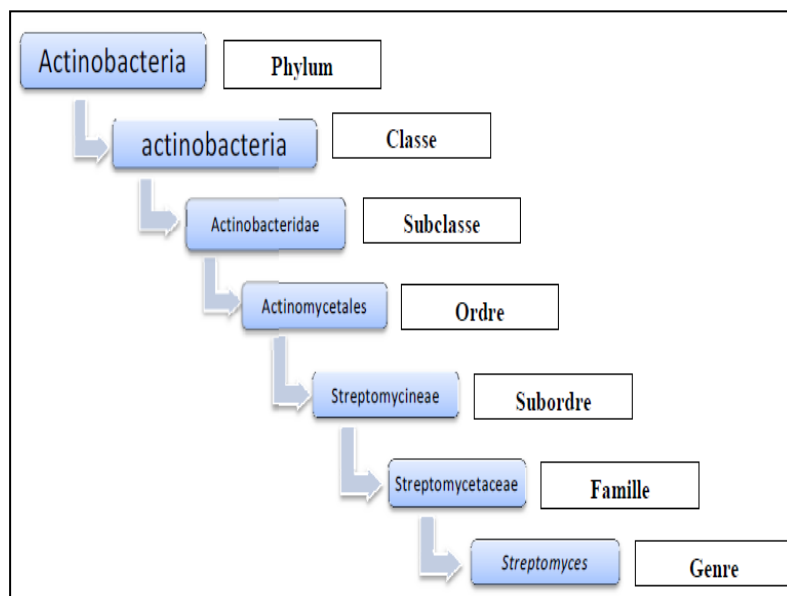


Fig. 8 : Classification du genre *Streptomyces* selon Bergy's, (2012).

2.3 Taxonomie des *Streptomyces*

Les *Streptomycètes* sont définies par des caractères chimiotaxonomiques et phénotypique. Maintenant tous les travaux se concentrent plus sur l'ARNr 16S et l'analyse de la paroi en acides gras.

Il y'a 4 types de classifications pour les *Streptomyces* : la classification phénotypique, numérique, la chimiotaxonomie et la taxonomie génétique :

2.4 Taxonomie phénotypique

Cette classification a été proposée par Cohn en 1872 et jusqu'au début des années 1960, la taxonomie des espèces bactériennes reposait sur une classification phénotypique. Elle utilise des caractères considérables comme l'habitat, le pouvoir pathogène, la morphologie, les spores et la mise en évidence de certains caractères biochimiques essentiels etc.

L'inconvénient de la classification phénotypique ne reflète que peu d'information sur les espèces (Smaoui, 2010). Le projet international des *Streptomyces* (ISP) a été en 1964, pour standardiser les critères de la détermination des espèces (Shirling et Gottlieb, 1972). Plusieurs chercheurs ont établi des critères clés suivants :

- La forme des chaînes de spores (réctiflexible : droites ou flexueuses ; spirale : hélicoïdales) ;
- La couleur du mycélium aérien sporulé avec sept classes (blanc, gris, jaune, rouge, bleu, vert et violet) ;
- La production de pigments mélanoïdes bruns à noirs ;
- L'ornementation de la paroi sporale (lisse, verruqueuses, échinulée ou chevelue) ;
- La présence ou non de pigments solubles ;
- La capacité d'utiliser certaines sources de carbone pour se développer (D- glucose, D-xylose, D-galactose, D-raffinose, D-mannitol, D-fructose, L- arabinose, L-rhamnose, inositol et saccharose).

Remarque : Néanmoins, il a été rapporté par Kämpfer (2006), que la taxonomie des *Streptomyces* basée la morphologie de la colonie est insuffisante, car dans ce genre cette morphologie est très variable et ne peut pas être considéré comme un critère solide pour la classification. Par contre, la couleur des spores est très importante.

2.4.1 Taxonomie numérique

La taxonomie numérique des bactéries repose sur l'étude de plusieurs critères macroscopiques, microscopiques, physiologiques et biochimiques à l'aide d'un logiciel qui peuvent contribuer dans la détermination du genre et de l'espèce. Cette méthode a été développée par **Sneath** en **1957**, où 134 caractères ont été étudiés pour développer une taxonomie qualifiée de numérique pour les bactéries (**Anderson et Wellington, 2001**).

2.4.2 Chemotaxonomie

Grace au développement des techniques rapides et sensibles comme la chromatographie (HPLC, CPG), l'électrophorèse et la spectroscopie couplé, l'approche chimiotaxonomique a été largement utilisée pour la classification des *Streptomyces*. Cependant, la chromatographie des acides gras, analyse des, profils protéiques des membranes cellulaire, les tests biochimiques et sérologie etc. ont permis de distinguer plusieurs groupes dans le genre *Streptomyces* (**Anderson & Wellington, 2001**).

2.4.3 Taxonomie Génétique

Les techniques de la biologie moléculaire ont joué un rôle important dans la classification des genres ou même des familles. Le tableau ci-contre explique les différentes techniques utilisées pour la classification des *Streptomyces* (**Anderson et Wellington, 2001**).

Tab. 4 : Les différentes méthodes moléculaires d'identification des *Streptomyces* (**Anderson et Wellington, 2001**).

Cible	Méthode	Spécificité
AND chromosomique totale	Hybridation ADN-ADN Restriction avec les endonucléases (RFLP) Isolement et clonage	Genre aux espèces Espèces à la souche Espèces à la souche
Gène de protéine ou fragment de gène 16S/23S ARNr	Isolement et séquençage du gène ou de fragments de gène Analyse comparatif de séquences	Espèces à la souche Famille, genre, espèces

2.5 Cycle de développement des *Streptomyces*

La croissance des *Streptomyces* peut se dérouler en milieu liquide ou solide, l'étude de leur cycle de différenciation se réalise préférentiellement en milieu solide. Ce sont en majorité des souches mésophiles, mais il existe quelques souches psychrophiles ou thermophiles. La gamme de pH optimale est comprise entre 6,5 et 8,0. Le cycle débute par la germination d'une spore, elle produise une structure morphologique semblable au tube germinatif de moisissure. Celle-ci

donne naissance à un mycélium du substrat (ou végétatif) (**fig. 9**) (**Manteca et Sanchez, 2009**). Ce dernier comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour lesquelles le degré hygrométrique joue un rôle important.

Parfois l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*. Le tube de germination croît et donne des hyphes qui se ramifient de manière apicale. L'ensemble de la colonie se développe d'une manière radiale. Le mycélium primaire est ancré dans le support solide pour puiser les nutriments. Cette formation de mycélium du substrat permet la dégrader de la matière organique insoluble grâce aux enzymes extracellulaires diffusé (**Emerson et al., 2012 ; Kitouni, 2007**).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphes, dressé sur le mycélium du substrat. Le plus souvent, ils sont pigmentés et sont enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe. Une fois développé, le mycélium aérien couvre les colonies de surfaces donnant un aspect poudreux compact, poilu ou en chou-fleur (**fig. 9**) (**Kitouni, 2007**).

En conséquence de la carence en nutriments, ce mycélium aérien commence à former des spores, ce mycélium aérien et ces spores donnant à la colonie de *Streptomyces* une apparence poudreuse, et chevelue (**Dworkinet al., 2006**).

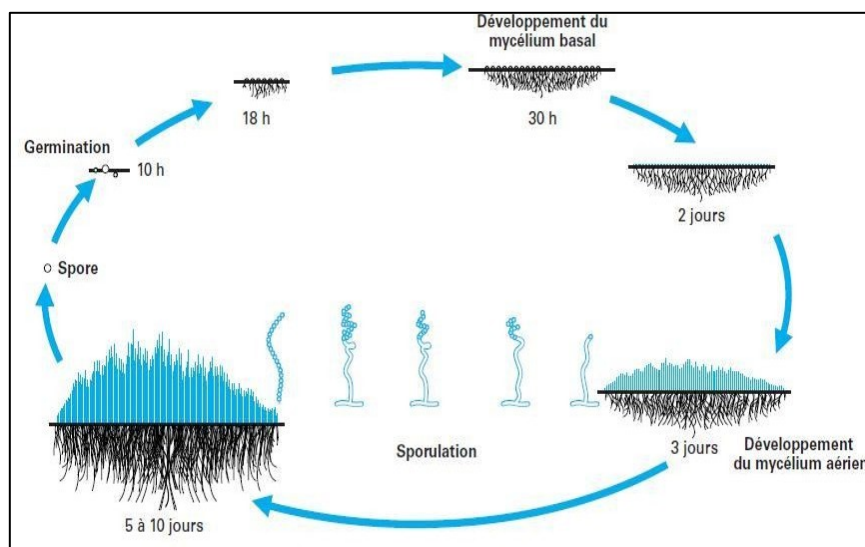


Fig. 9 : Cycle de vie des *Streptomyces* (**Scherr et Nguyen, 2009 ; Delaunay et al., 2003**)

Remarque :

En milieu liquide une aération est nécessaire par agitation ou par injection d'air puisque ces bactéries sont aérobies strictes. Dans ce milieu, les cellules se développent uniquement sous

forme de mycélium primaire, même si certaines souches peuvent sporuler (**fig. 3**) (**Madigan et al., 1997**).

2.6 Applications des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* trouvent de nombreuses applications dans les différents domaines les tableaux cités dans les sous titres résument les principales utilisations des différentes espèces.

2.6.1 Dans le domaine pharmaceutique

Les applications pharmaceutiques sont multiples des *Streptomyces*, elles sont très répandues dans les fabrications des antibiotiques (**tab.5**).

Tab. 5: Liste de quelques antibiotiques synthétisés par les variations de *Streptomyces*(2).

Antibiotiques	Espèces	Application
Anthracyclines	<i>S. galileus</i>	Antitumoral
Arénimycine	<i>S. arenicola</i>	Antibactérien; anticancéreux
Bafilomycine	<i>S. griseus, S. halstedii</i>	ATPase; inhibiteur de microorganismes cellules
Chloramphénicol	<i>S. venezuelae</i>	Antibactérien; inhibiteur de la biosynthèse des protéines
Hygromycine	<i>S. hygrosopicus</i>	Antimicrobien; immunosuppresseur
Mitomycine	<i>S. lavendulae</i>	Antitumoral; se lie à l'ADN double brin
Rapamycine	<i>S. hygrosopicus</i>	immunosuppresseur; antifongique
Streptozotocine	<i>S. achromogenes</i>	Diabétogène

2.6.2 Bioherbicides

Plusieurs métabolites secondaires sont produits synthétisés par des *Streptomyces* et utilisés comme herbicides contre les mauvaises herbes indésirables (**tab. 6**).

Tab. 6 : Quelques herbicides produits par des *Streptomyces* (2).

Bio-herbicides	Utilisations	Souches
Anisomycine	Inhibiteur de la croissance des mauvaises herbes graminées telles que la basse-cour et les mauvaises herbes à feuilles larges.	<i>Streptomyces</i> sp.
Bialaphos	Lutte contre les mauvaises herbes graminées et vivaces et les mauvaises herbes à feuilles larges	<i>S. viridochromogenes</i>
Coformycine et hydantocidine carbocycliques	Contrôle de plusieurs mauvaises herbes.	<i>S. hygrosopicus</i>
Herbicidines et herbimycines	Monocotylédone et dicotylédone	<i>S. saganonensis</i>
Phthoxazoline, hydantocidine et homoalanosine	Contrôle de plusieurs mauvaises herbes	<i>Streptomyces</i> sp.

2.6.3 En biotechnologie

Les *Streptomyces* sont d'excellents producteurs d'enzymes ayant des applications biotechnologiques multiples (**tab. 7**).

Tab. 7 : Liste de quelques enzymes synthétisés par diverses *Streptomyces* et leur application industrielle(2).

Enzymes	Industrie	Utilisations	Souches
Aminoacylase	Médicaments	Production de pénicillines semi-synthétiques et de celpholosorine	<i>S. olivaceus</i> <i>S. roseisclerotics</i> <i>S. sparsogenes</i>
Amylase	Détergent	Enlèvement des taches	<i>Streptomyces</i> sp.
	Cuisson	Ramollissement du pain; le volume	<i>S. erumpons</i>
	Papier et pâte	Désencrage	
	Amidon	Production de glucose, fructose, sirops	
	Textile	Enlèvement de l'amidon des tissus	
Hydrolase peptidique	Médicaments	Biosynthèse industrielle de l'oxytétracycline	<i>S. rimosus</i>
Pénicilline Amidase	Signification commerciale	Production d'acide 6-aminopénicillanique à l'échelle industrielle	<i>Streptomyces</i> sp.
Phytase	L'alimentation animale	Digestibilité des phytates	<i>S. luteogriseus</i> R10
Tyrosinase	Pharmacie	Synthèse de L-Dopa	<i>S. cyaneofuscatus</i>
β - N -Acétyl-D-glucosaminidase	Etudier leurs fonctions biochimiques	Détermination structurelle de la fraction glucidique de glycoprotéines	<i>S. griseus</i>

Chapitre II :
Généralités sur les antibiotiques

II. Généralités sur les antibiotiques

1. Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont toutes substances chimiques produites par des micro-organismes capables d'inhiber et de détruit le développement les bactéries d'autres micro-organismes (Waksman, 1943). D'après Turpin et Velu (1957), Yahi, (1997), Hellali, (1999), et Puyt et Fauble (2002), les antibiotiques sont tous composés chimiques, élaboré par des organismes vivants ou par voie synthétique, dont l'activité thérapeutique se manifeste à très de faible dose et d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard de certains virus, ou même de certaines êtres pluricellulaires.

2. Origine des antibiotiques

L'antibiothérapie est désignée comme une chimiothérapie un traitement par les antibiotiques (antibactériens, antifongiques et antiviraux) à des fins curatives ou préventives. Il s'agit le plus souvent d'une monothérapie, parfois une bithérapie, voire une trithérapie dans certains cas comme pour le traitement de la tuberculose (Denyer *et al.*, 2004). Les antibiotiques sont obtenus par diverses voies :

- **Naturelles issues de microorganismes**, exemple : La majorité des antibiotiques naturels commercialisés sont produits par le genre d'actinomycète.
- **Semi-synthétiques** : Ils sont représentés par des molécules d'origine naturelle ayant subi une modification par l'addition de groupes chimiques supplémentaires, dans le but de les rends plus efficaces à l'inactivation des microorganismes. Beaucoup d'antibiotiques semi-synthétiques présentent un spectre d'activité plus large que les molécules d'origines comme la pénicilline V et la méthicilline (Willey *et al.*, 2008).

3. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont constitués de molécules cycliques dont leurs structures sont plus ou moins complexes et très variées. D'après, Larpent et Sanglier(1989), diverses classifications sont possibles selon le type de structure, on peut distinguer quatre principaux types (**fig. 10**) :

- Les antibiotiques osidiques tels que les holosidiques comme les aminosides (**fig. 10, B et C**) par exemple : streptomycine, Kanamycine et les hétérosidiques tels que, les macrolides (erythromycine), les lincomycines, les antifongiques (nystatine) etc.
- Les antibiotiques protidiques peuvent correspondre à un seul acide aminé comme le chloramphénicol, les sulfamides et la cyclosérine soit à la condensation de deux acides aminés tels que les bêta-lactamines et les quinolones ou à un polypeptide (les polymyxines) (**fig. 10, A et E**).

- Les antibiotiques de nature lipidiques par exemple l'acide fusidique (**fig. 10, F**).
- Les antibiotiques comportant des cycles condensés comme les tétracyclines (**fig. 10, B**).

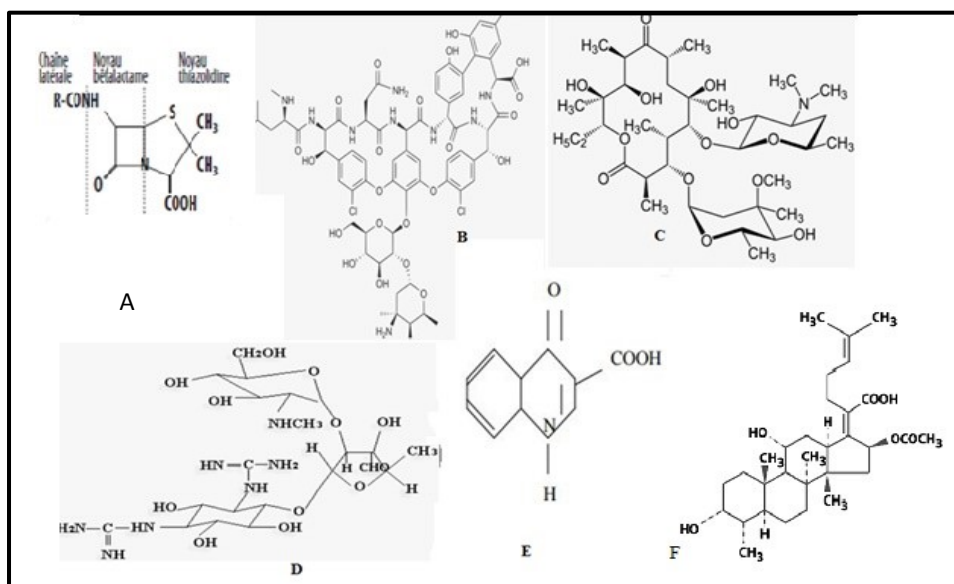


Fig. 10 : Les structures chimiques des cinq grandes familles des antibiotiques (**Prescott et al. 2007**). A : Les β - lactamines (pénicillium) ; B : Les glycopeptides ; C : Les aminosides (stréptomycine) ; D : les macrolides (erythromycine) ; E : Les quinolones ; F : l'acide fusidique

Les antibiotiques peuvent être classés en cinq grandes familles selon plusieurs critères (**Larpent et Sanglier, 1989**) : Leurs origines, Leurs natures chimiques, Leurs mécanismes d'action au niveau moléculaire et le spectre d'action, Leurs charges électriques, Leurs compositions chimiques et leurs caractères de résistance et les effets secondaires.

➤ **Les β - lactamines**

Les bêta-lactamines constituent la famille d'antibiotiques la plus utilisée en antibiothérapie. Ils représentent une vaste famille d'antibiotiques bactéricides qui possèdent comme structure de base le cycle bêta-lactame (**tab 8**) (**fig. 10, A**) (**Laurent, 2009**).

Tab. 8: Classification des β -lactamines selon la structure (**Archambaud, 2009**).

Noyau pénames	Noyau céphems	Les carbapénèmes : Noyau pénams
Pénicilline G-Pénicilline M (mécicilline)- Pénicilline A (aminopénicilline)- Carboxy pénicillines (ticarcilline)- Uréido- pénicillines (pipéracilline)-Aminopénicilline	Céfalotine- Céfuroxime Céfamandole-Céfotaxime Céfépime- Ceftriaxone- Cefpirome	Imipénème Monobactame

- **Les glycopeptides :** Cette famille renferme des antibiotiques importants comme la Vancomycine et Teicoplanine. Ces deux molécules n'agissent que sur les bactéries à Gram positif en inhibant la synthèse du peptidoglycane et donc la croissance des bactéries (Mouton *et al.*, 2000).
- **Les aminosides :** Leur structure est à base de sucres aminés, les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Netilmicine, Tobramycine, Amikacine sont des antibiotiques bactéricides. Ils se fixent de façon irréversible sur les ribosomes des bactéries et inhibent la traduction en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager (Archambaud, 2009).
- **Macrolides :** Les antibiotiques macrolides sont caractérisés par le cycle lactone relié aux molécules de sucres. Il y a une grande variété d'antibiotiques macrolides, le plus connu est l'érythromycine. C'est un inhibiteur de synthèse de protéine au niveau de la sous-unité 50S du ribosome (effet bactériostatiques) (Madigan et Martinko, 2007).
- **Quinolones :** Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, selon l'évolution des résistances des microorganismes, on distingue trois générations (tab. 9). Ils sont très efficaces contre les bactéries entériques comme *E. coli* et *Klebsiella pneumoniae* et contre *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas aeruginosa* et d'autres bactéries pathogènes Gram négatives. Ainsi que, les Gram positives telles que *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pyogenes* et *Mycobacterium tuberculosis*. Ils sont utilisés dans le traitement des infections du système urinaire (Prescott *et al.*, 2007).

Tab. 9 : La classification des quinolones selon certains auteurs.

1 ^{ère} génération (Tilloston, 1996)	2 ^{ème} génération (Fluoroquinolones) (King <i>et al.</i> , 2000 ; Blondeau, 2004)	3 ^{ème} génération (Emami <i>et al.</i> , 2005 ; Saravana <i>et al.</i> , 2011)
Acide nalidixique la cinoxacine l'acide pipémidique	Norfloxacine, Ciprofloxacine Ofloxacine,	Lévofloxacine, Moxifloxacine Pazufloxacine

4. Mode d'action des antibiotiques

D'après Madigan *et al.* (2012), les mécanismes d'action des principaux antibiotiques au niveau de la cellule bactérienne sont multiples (action sur la paroi, la membrane etc.)(fig. 11).

4.1. La paroi

Selon Talbert *et al.* (2009), certains antibiotiques des familles de β -lactame et des glycopeptides inhibent l'activité de l'enzyme transpeptidase, qui joue un rôle importante dans

l'assemblage du peptidoglycane de la paroi cellulaire (**tab. 10**) (**fig. 11**). Ce qui entraîne la fragilisation de la paroi cellulaire, notamment chez les micro-organismes Gram positif. Les bactéries Gram négatives ont tendance à être moins sensibles (ex : à la pénicilline) car leur enveloppe externe empêche l'antibiotique d'atteindre la couche de peptidoglycane de la cellule (**Perry et al., 2002**).

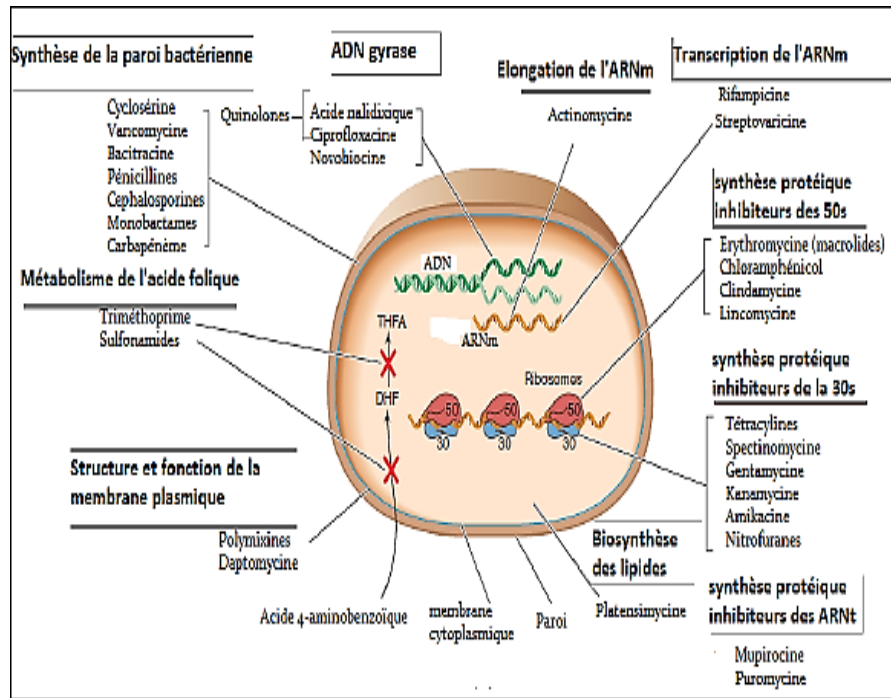


Fig. 11 : Mécanisme d'action des principaux antibiotiques (**Madigan et al., 2012**).

DHF : acide dihydrofolique ; **THFA** : acide tétrahydrofolique (précurseur de l'acide folique).

4.2.La membrane cytoplasmique

Les antibiotiques polypeptidiques comme la polymyxine et la tyrocidine sont des produits d'origine bactérienne du genre *Bacillus*, inhibiteurs des membranes cellulaires (**tab. 10**) (**Talbert, et al., 2009**). La tyrocidine est un ionophore, qui perturbe la perméabilité sélective en formant des canaux à travers la membrane cellulaire. Cela entraîne la perte de cations monovalents, par conséquent, la pompe de proton va être altérée ce qui empêche le transport vers l'intérieur ou l'extérieur du cytoplasme et provoque un dysfonctionnement cellulaire (**fig. 11**). La polymyxine provoque des dommages similaires à la membrane cytoplasmique. Les antibiotiques peptidiques ne sont pas appliqués par la voie orale, mais appliqués par voie externe pour traiter des infections cutanées (**Perry et al., 2002**).

4.3. Le chromosome

La synthèse des ADN chromosomiques peuvent être inhibé par les quinolones (Talbert *et al.*, 2009). Ces antibiotiques inhibent l'ADN gyrase en bloquant le déroulement de l'ADN qui est une étape importante du démarrage de la réplication. Toutefois, les quinolones bloques la réparation et la transcription de l'ADN en ARN messager (tab. 10) (fig. 11) (Prescott *et al.*, 2007).

4.4. Le ribosome

Les antibiotiques antibactériens qui inhibent la synthèse protéique, se fixent aux ribosomes bactériens tels que les cyclines, les aminosides et les macrolides (tab. 10). Dans certains cas cliniques, l'association de deux antibiotiques présentant des sites d'action différents sur la bactérie permet d'obtenir une meilleure efficacité thérapeutique (Perry *et al.*, 2002 ; Talbert *et al.*, 2009).

Les antibiotiques les plus sélectifs sont ceux qui interagissent avec la synthèse des parois bactériennes (les pénicillines, les céphalosporines, la vancomycine et la bacitracine). Ces produits ont un indice thérapeutique élevé parce que les parois bactériennes possèdent une structure unique inexistante dans les cellules eucaryotes (tab. 10) (Prescott *et al.*, 2007).

Tab. 10 : Principaux antibiotiques classés selon leur site d'action (Figarella *et al.*, 2007).

Site d'action	Paroi	Membrane	Chromosome	Ribosomes
Antibiotiques	Pénicilline	Thyrothricine	Actinomycine	Aminosides
	Cyclosérine	Polymyxine	Rifamycine	Chloramphénicol
	Bacitracine		Mitomycine	Tétracycline
	Novobiocine		Acide nalidixique	

5. Résistance bactérienne aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est la capacité d'un microorganisme à résister aux effets des antibiotiques (Othniel, 2011). On distingue deux types de résistance :

5.1. La résistance naturelle

La résistance naturelle ou intrinsèque est présente chez toutes les souches d'une espèce bactérienne donné, par l'expression d'une protéine naturelle empêchant l'antibiotique d'accéder à sa cible, le cas des *E. coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosae* face à l'ampicilline (Madigan *et al.*, 2012).

5.2. La résistance acquise

Elle est apparue avec l'emploi d'une antibiothérapie chez une espèce bactérienne initialement sensible. Elle est évolutive et il existe deux types :

- **Chromosomique** : conséquence d'une mutation qui apparaît dans le chromosome, elle peut inclure toute la famille d'un antibiotique. C'est un processus spontané qui se produit par exemple dans le gène qui code pour une protéine ciblée par l'antibiotique, rendant ce dernier inefficace contre ce mutant.
- **Plasmidique** : le plasmide qui contient le gène de résistance peut se transmettre en générale par conjugaison permettant ainsi la propagation rapide des résistances, souvent plusieurs gènes de résistance peuvent se regrouper chez un seul plasmide (Madigan et al., 2012).

6. Importants mécanismes biochimiques de résistances aux antibiotiques

6.1. Inactivation enzymatique de l'antibiotique

Chez les bactéries Gram positives et dans l'espace extracellulaire ou périplasmique chez bactéries Gram négatives, les pénicillines peuvent en contrer des β -lactamases (pénicillinases et céphalosporinases) produites par la bactérie, et qui ouvre le cycle β -lactame de l'antibiotique (Gaudy et Buxeraud, 2005).

6.2. Modification de la cible

Elle peut se produire à la suite d'une mutation sur le site de fixation de l'antibiotique. La résistance est antérieure à la diminution de l'affinité du β -lactame vis-à-vis des PLP, une augmentation de la biosynthèse de ces protéines ou de l'induction de nouvelles PLP de faible affinité pour l'antibiotique. Chez les Gram positifs, ces divers mécanismes sont à la base de la résistance de *Staphylococcus aureus*, de *Streptococcus pneumoniae* et des entérocoques (Gaudy et Buxeraud, 2005).

6.3. Mécanisme d'efflux

Ce mécanisme se trouve notamment chez certaines bactéries de Gram négatif telles que *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium mageritensis* et *S. aureus*. Il se manifeste par rejet de l'antibiotique une fois qu'il arrive à entrer dans la cellule. Par le biais de « pompes effluentes » présentes dans la membrane plasmidique, des translocases permettent d'expulser l'antibiotique (Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Prescott et al., 2003).

6.4. Diminution de la perméabilité membranaire (absence de pénétration)

Cette manifestation peut être naturelle ou acquise, certains antibiotiques ne rentrent dans la cellule que grâce à une perméase spécifique. C'est le cas de la streptomycine, l'absence ou le non fonctionnement de cette perméase rend la cellule imperméable à l'antibiotique (**Gaudy et Buxeraud, 2005 ; Prescott *et al.*, 2003**).

Chapitre III :

**Présentation des souches *P. aeruginosa*
*et B. subtilis***

III. Présentation des souches *P. aeruginosa* et *B. subtilis*

1. Définition substance antimicrobienne

Le terme antimicrobien désigne toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance. Les agents antimicrobiens sont utilisés depuis des décennies pour traiter les maladies transmissibles et prévenir les infections. Le mode d'action de ces agents sur les bactéries, peuvent être : Bactériostatique, lorsque la substance inhibe la multiplication des bactéries ou bactéricides : lorsque la substance détruit totalement les bactéries (Cce, 2001).

2. Les souches bactériennes testées

Pour mettre en évidence la capacité antibactérienne des fractions huileuses et des extraits antibiotiques de la *Streptomyète*, deux souches microbiennes ont été utilisé : *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*, les deux souches sont des bactéries de référence de type ATCC (American Type Culture Collection) (tab 11).

Tableau 11 : Les références de deux souches testées.

Souche	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus subtilis</i>
Référence	ATCC27853	ATCC6633

2.1. *Pseudomonas aeruginosa*

2.1.1. Caractéristiques générales

La souche *Pseudomonas aeruginosa* a été isolée pour la première fois en 1882 par Charles Gessard comme agent de surinfection des plaies au cours de la 1^{ère} guerre mondiale (Chaker, 2012). C'est une bactérie bacille à Gram négatif non sporulant. Il mesure 1 à 5 µm de long et 0,5 à 1 µm de large (fig. 12). *P. aeruginosa* est une bactérie motile grâce à la présence d'un flagelle monotriche polaire. Cette bactérie est mésophile. Elle est capable de se développer dans des températures allant de +4°C à +45°C. La température optimale de croissance se situe entre 30 et 37°C.

P. aeruginosa est une bactérie aérobie et possède un métabolisme oxydatif. Elle utilise l'oxygène comme accepteur d'électrons, mais en absence de ce dernier, elle peut utiliser les nitrates comme accepteur d'électrons (Vasil, 1986). La morphologie de *P. aeruginosa*, de même que pour tout le genre *Pseudomonas* est facilement distinctive grâce à la production de la pyocyanine, un pigment bleu-vert diffusible dans le milieu extracellulaire, d'où le nom de bacille pyocyanique (Gessard, 1984).

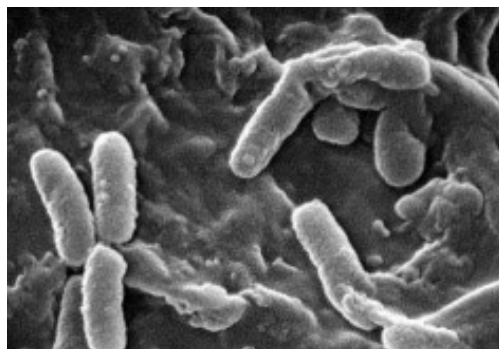


Fig. 12 : *Pseudomonas aeruginosa* vue au microscope électronique(3)

2.1.2. Taxonomie

Selon Chaker, (2012), l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* appartient au taxon suivant :

Tableau 12: Taxonomie de *Pseudomonas aeruginosa* (Chaker H, 2012)

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Prokaryota</i>
Division	<i>Proteobacteria</i>
Classe	<i>Gammaproteobacteria</i>
Ordre	<i>Pseudomonadales</i>
Famille	<i>Pseudomonadaceae</i>
Genre	<i>Pseudomonas</i>
Espèce	<i>Aeruginosa</i>

2.2. *Bacillus subtilis*

2.2.1. Caractéristiques générales du genre

Bacillus subtilis, connu aussi comme le bacille du foin ou le bacille de l'herbe, est une bactérie Gram-positif, catalase-positif. Cette espèce ubiquitaire, sa longueur varie de 2 à 4 μm et sa largeur de 0,5 à 2 μm . Elle a pour forme cellulaire des bâtonnets droits à bout arrondis. Elle est mobile grâce à une ciliature péritriche (un système de flagelle qui recouvre tous les côtés de la surface d'une bactérie). Elle est aérobie stricte, sa température optimale est de 40 °C trouvée dans le sol. Peut former une endospore dure protectrice, classé comme un aérobie obligatoire (Bridier *et al.*, 2010). C'est une Bactérie antagoniste de nombreux champignons pathogènes et utilisé comme moyen de lutte biologique contre de nombreuses cultures et particulièrement contre la pourriture grise des vignes (Sonenshein, 2001).

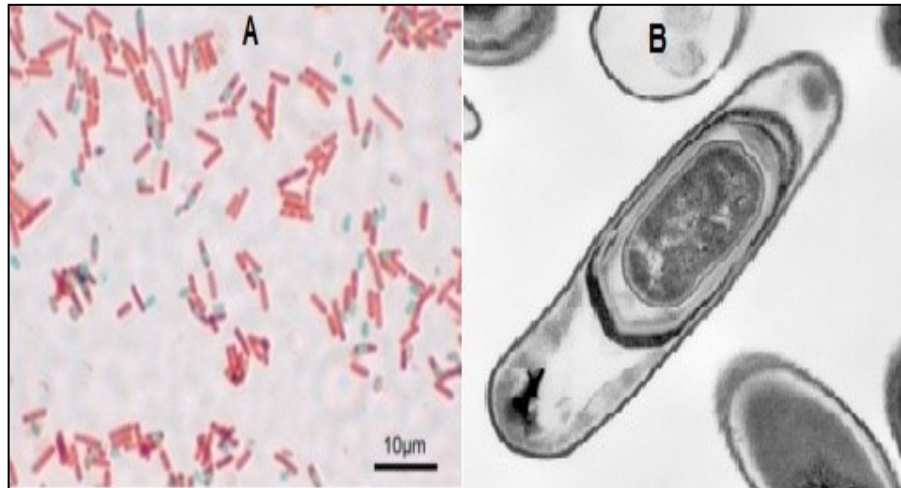


Fig. 13 : *B. subtilis* observé en microscopie électronique(5).

A : Coloration de Gram de *Bacillus subtilis*(4) ; **B :** Endospore de *B. subtilis*

2.2.2. Taxonomies

La classification des *Bacillus subtilis*

Tableau 13: Taxonomie de *Bacillus subtilis* (Delerras, 2007)

Règne	<i>Bacteria</i>
Embranchement	<i>Firmicutes</i>
Classe	<i>Bacilli</i>
Ordre	<i>Bacillales</i>
Famille	<i>Bacillaceae</i>
Genre	<i>Bacillus</i>
Espèce	<i>Subtilis</i>

Partie expérimentale

Matériel
et
Méthodes

IV. Matériel et méthodes

1. L'objectif global

L'objectif principal de ce travail est focalisé sur un isolement et une purification de quelques souches bactériennes d'actinomycètes du genre *Streptomyces* par des tests physiologiques et biochimiques. Les tests différents des isolats d'actinomycètes ont permis une évaluation préliminaire pour une éventuelle fermentation dans un milieu liquide pour l'obtention de certains métabolites primaire (lipides) et secondaire (antibiotiques), les extraits d'antibiotiques et des lipidiques ont fait l'objet d'une évaluation de leur pouvoir antibactérienne par de test d'antibiogramme sur un milieu solide.

2. Protocole expérimental général

La figure 14 englobe les différentes étapes suivie dans le protocole expérimental.

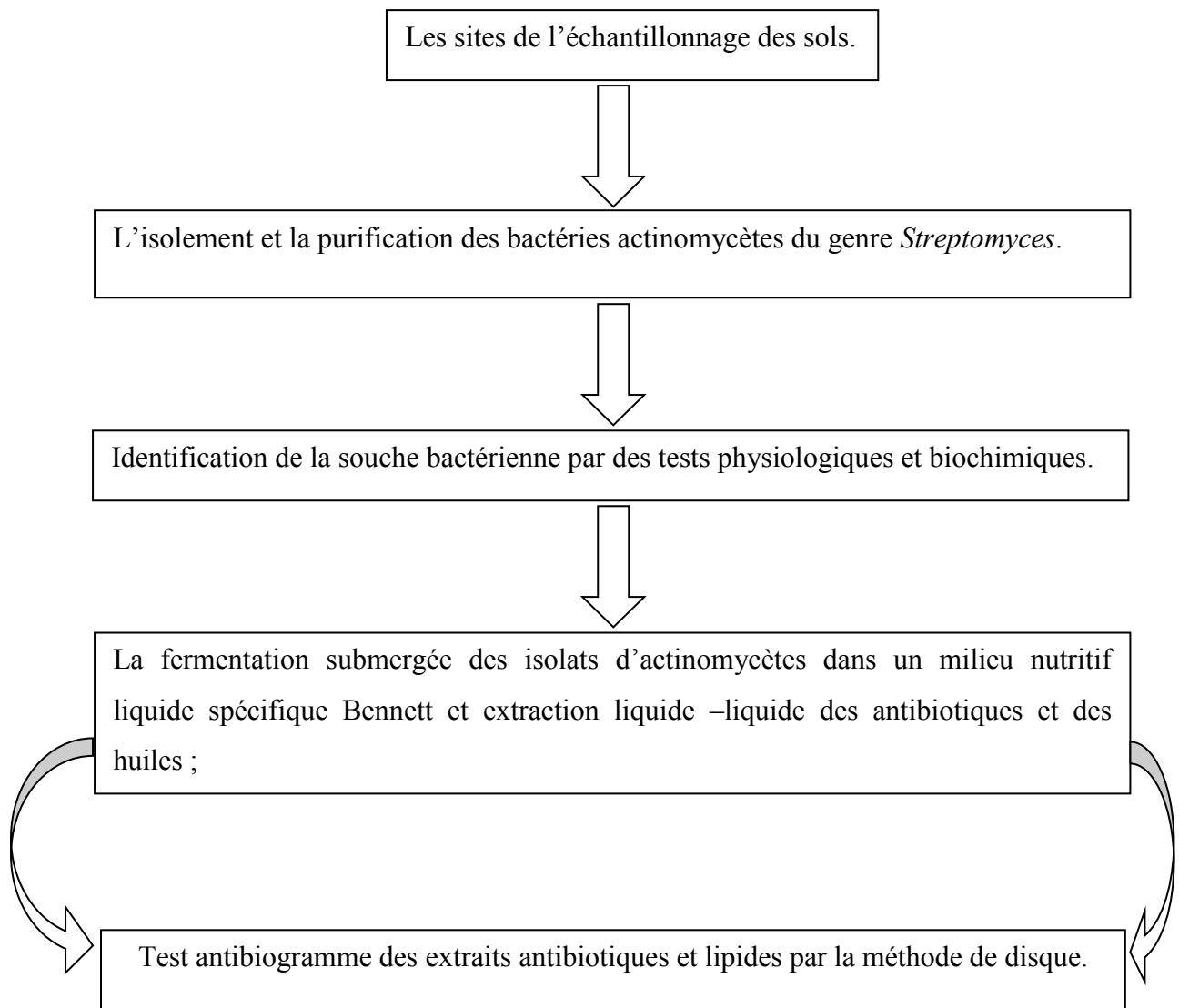


Fig. 14 : Les différentes étapes du protocole expérimental.

3. Site des prélèvements des échantillons

Les échantillons ont été prélevés le 10 février 2019 à partir d'un sol foresterie, ce dernier est localisé dans la région d'Abdelmalek Ramdane (Ouillis) de la wilaya de Mostaganem. Le site est situé à $36^{\circ} 06' 12''$ Nord et $0^{\circ} 16' 34''$ Est, il présente une superficie de 75 km^2 , la température journalière est de 21°C , avec une humidité de 56 % (**fig. 15**).



Fig. 15 : Site des prélèvements des échantillons région Abdelmalek Ramdane (Ouillis) de la wilaya de Mostaganem (photo prise le 10/02/2019).

A : la zone des prélèvements ; **B, C, D, E et F** : Les points des prélèvements

Quatre échantillons sont prélevés aseptiquement à une profondeur d'environ 25 cm (**fig. 15**). Les sols ont été placés dans des sacs stériles. Chaque échantillon est prélevé selon la méthode de cinq points aliquotes récupérer sur une surface de 100 m^2 (**fig. 15**).

4. Isolement et purification des actinomycètes (*Streptomyces*)

4.1. Préparation des suspensions du sol

La préparation des solutions de sol se fait par la méthode de suspension-dilutions. La suspension-mère du sol est préparée par l'addition de 1 g de sol dans 9 ml d'eau distillée stérile, après homogénéisation au vortex, on réalise une série des dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} dans l'eau physiologique stérile (**fig. 16**).



Fig. 16 : Présentation des différentes dilutions de suspensions du sol.

4.2. Ensemencement des suspensions de sol

Un volume de 0,1 ml de chaque dilution (10^{-1} à 10^{-5} ml/g) a été étalé à la surface d'un milieu sélectif des actinomycètes agar amidon caséine dont la composition est mentionnée dans l'annexe I. À l'aide d'une pipette pasteur stérile sous forme de râteau, trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon, les boîtes de Pétrie ont été incubées à 30°C pendant 7 à 14 jours selon le protocole de **Collins *et al.*, (1995)** et **Sudha et Hemalatha, (2015)**.

4.3. Purification et conservation des isolats

Afin d'obtenir des souches pures, les différentes colonies obtenues sont repiquées et ensemencées par la méthode des stries sur des boîtes Pétri contenant le même milieu d'isolement, puis incubées pendant 1 semaine à 30°C . Cette dernière opération est répétée jusqu'à obtention de souches pures. La souche pure doit être conservée à 4°C pour une réalisation ultérieure des tests biochimiques, physiologiques et la fermentation (**Shirling et Gottlieb, 1969**).

5. Caractérisation des Actinobactéries

5.1. Caractérisation macroscopique

Après 7 jours d'incubation, les boîtes contenant des colonies suspectes sont observées à la loupe binoculaire (ZEISS 475022 G 10x), les caractéristiques macroscopiques telles que la taille, la forme, la texture, la couleur, la marge et les pigmentations diffusibles sur les milieux de culture ont été déterminées selon le protocole de **prescott et al., 2010 et Saravana et al., 2012**. Les aspects macroscopiques sont regroupés tableau quatre, présentés et discuté dans le chapitre quatre.

5.2. Caractérisation microscopique

Avant de repiquer les différents isolats sur le même milieu d'isolement afin de les conserver, un étalement sur une lame à l'état frais est effectué pour vérifier l'aspect microscopique des colonies suspectes. L'observation microscopique des actinomycètes a été effectuée au grossissement 10x, 40x et puis G100x. Après une coloration de Gram a été réalisé pour confirmer que les bactéries sont de Gram positifs, suivie d'une description des filaments ou des spores (chaines de spores), des conidies, des sporanges ou toutes autres formes caractéristiques des actinomycètes selon le protocole de **Shirling et Gottlieb (1966)**.

- **Préparation des frottis :** Sur des lames propres, les frottis des souches isolées ont été réalisés. Une colonie est bien étalée avec une goutte d'eau physiologique distillée, puis fixés en les passant par des mouvements rapides dans la flamme au bec Bunsen.
- **Coloration :** Les principales étapes de cette coloration sont les suivantes :
 - ✓ Recouvrir les frottis par le cristal violet et les laisser pendant une minute ;
 - ✓ Rincer la lame avec de l'eau ;
 - ✓ Recouvrir la lame avec du Lugol et laisser agir une minute exactement ;
 - ✓ Laver avec de l'eau, puis décolorer avec de l'alcool, en recouvrant la lame et en laissant agir pendant 30 secondes ;
 - ✓ Laver avec de l'eau, recouvrir la lame avec la Fushine, laissé agir une minute ;
 - ✓ Laver avec de l'eau, sécher la lame avec un papier absorbant.

Observation au microscope optique du faible grossissement 10x jusqu'au fort (G100 x).

5.3. Caractérisation physiologique et biochimique

Une série de tests physiologiques et biochimique sont utilisés par les taxonomistes sont retenues pour l'identification et la différenciation entre les différentes espèces des actinomycètes.

5.3.1. L'hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 10 jours d'incubation à 30°C, la gélose a été recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est ainsi mise en évidence par l'absence de la coloration autour des colonies. A l'inverse, les autres zones du milieu qui contiennent l'amidon, elles se colorent en brun (**Kitouni, 2007**).

5.3.2. La dégradation de l'urée

Ce test est basé sur l'ensemencement de suspension d'actinobactérie dans le milieu contenant le rouge de phénol et l'incubation pendant de 7 à 10 jours à 30°C. Ces milieux prennent une teinte rouge si l'urée est dégradée cela signifie que les souches possèdent des enzymes uréases (**Guiraud, 1998**).

5.3.3. L'utilisation de citrate

Ce test détermine la capacité d'un microorganisme à utiliser le citrate comme la seule source de carbone. Des cultures des différents isolats sur milieu citrate de Simmons sont incubées à 30°C et observées quotidiennement jusqu'au 14 jours. La dégradation du citrate se traduit par une alcalinisation du milieu révélée par le virage du bleu de bromothymol à sa teinte basique. (**Guiraud, 1998**).

5.3.4. Les réactions VP et RM

Les différentes colonies des isolats ont été ensemencées à part dans des tubes contenant un milieu liquide Clark et Lubs, puis incubées à 30°C durant 7 à 10 jours. Après incubation, deux réactions de colorations doivent être faites pour mettre en évidence d'étudier une voie de fermentation du glucose (la voie du butane diol et la voie acides mixtes).

- **Réaction au Rouge de Méthyle** : Ajouter 1 à 2 gouttes d'une solution de rouge de méthyle à 0,5% préparé dans l'alcool 60° à 2 ml du milieu. L'obtention d'une coloration rouge du milieu, correspondant de la fermentation acide mixte par acidification (un pH inférieur à 4,2) d'un milieu glucosé après fermentation du glucose, est considérée comme positive. Une coloration jaune du milieu, correspondant à un pH supérieur à 6,3, est considérée comme négative.
- **Réaction de Voges-Proskauer** : Ajouter 0,5 ml d'une solution d' α -naphthol alcoolique à 6% et 0,5 ml d'une solution aqueuse de soude à 16% à 1 ml du milieu de culture tube. Agiter fortement et attendre 15 minutes. L'apparition d'une coloration rouge, indiquant la production d'acétoïne (ou 3-hydroxy-butanone), est considérée comme positive.

5.3.5. La réduction de nitrate réductase

La recherche de nitrate réductase est réalisée sur milieu mannitol-mobilité, après ensemencement et incubation des tubes pendant 7 à 10 jours à 30° C, l'observation s'effectue après l'introduction dans le tubes de quelques gouttes de deux réactif nitrate réductase 1 (l'acide sulfanilique) et nitrate réductase 2 (naphtylamine). Si la surface du milieu se colore en rouge cela indique la réduction du nitrate par l'enzyme nitrate réductase. En cas d'absence de coloration, l'ajout de poudre de zinc dans le tube et l'apparition d'une coloration rose cela indique la présence de nitrite (NO₂), par réduction des nitrates en nitrites par le zinc. Si la pente reste incolore, cela indique que le nitrate est réduit complètement au-delà du stade des nitrites en azote gazeux (Camille, 2007).

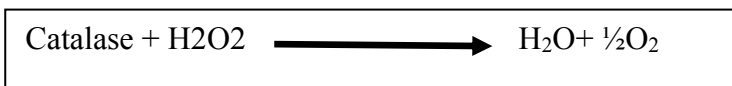
5.3.6. La fermentation du glucose, lactose, saccharose et la production de H₂S:

Ce test est réalisé en utilisant le milieu TSI (gélose au Glucose, Lactose, Saccharose) et production du H₂S. Des tubes contenant le milieu TSI sont ensemencés puis incubés pendant 7 à 10 jours à 30°C (Marchal *et al.*, 1991). Les résultats s'expriment comme suit :

- Le test lactose-saccharose est positif si la couleur pente de la gélose TSI vire au jaune ;
- Le test glucose est positif, apparition d'un culot jaune ;
- Production du H₂S est positif, apparition d'un noircissement du milieu dans la zone joignant la pente.

5.3.7. La catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H₂O₂ qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air:



Cette réaction est mise en évidence par un simple contact de la culture avec une solution fraîche de H₂O₂ à 10 %, une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène, le test catalase est considéré positif. S'il n'y a pas de bulles le test est négatif (Delarras, 2007).

5.3.8. Hydrolyse de la gélatine

Les actinobactéries ont été ensemencées sur une gélose nutritive contenant 0,4% de gélatine, ensuite, incubées à 30°C. L'observation des zones claires autour des colonies correspondent à l'hydrolyse de la gélatine ((Geraldine *et al.*, 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996).).

5.3.9. Recherche d'une caséinase

L'hydrolyse de la caséine a été étudiée sur un milieu gélosé riche en lait écrémé dont sa composition est mentionnée dans l'annexe. L'ensemencement des isolats à tester a été réalisé par des stries et incubé à 30°C. Après 7 jours, l'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine (**Raval *et al.*, 2012 ; Roy *et al.*, 2014**).

5.3.10. Recherche d'une lécithinase

Un milieu gélose à base de lécithines a été utilisé pour tester les différents isolats afin de mettre en évidence leurs capacités à dégrader cette substance par la lécithinase produites par les souches. La composition du milieu est rapportée dans l'annexe. L'ensemencement des isolats à tester a été établi par des stries, puis incubée à 30° C.

D'après **Nitsch et Kutzner (1969)**, le jaune d'œuf utilisé dans le milieu de culture est un substrat composé de lécithine, de triglycérides et d'une lipoprotéine. Il permet donc de rechercher trois enzymes en même temps :

- La lécithinase : se traduit par l'apparition d'un halo opaque, blanc perlé jaunâtre, à bord net sous la colonie ou à sa limite ;
- La lipase : est indiquée par l'apparition d'un halo blanc perlé huileux et brillant ;
- La lipoprotéinase : se traduit par l'apparition d'un halo clair autour de la colonie.

6. Production d'antibiotique et d'huile sur un milieu liquide

6.1. Préparation des cultures (inoculum)

A partir d'une culture jeune de l'actinomycète sur le Bennett gélosé, une suspension bactérienne servira à préparer l'inoculum. Les spores ont été raclées par l'ajout de 10 ml de l'eau dessillée stérile. Suivie d'une agitation vigoureuse, la densité optique de l'inoculum est mesurée par spectrophotomètre UV-visible à une longueur d'onde $\lambda = 540$ nm. La préparation doit être ajustée à une DO = 0,8 qui correspond à une valeur de 10^6 UFC/ml

6.2. Fermentation submergé de l'inoculum

Des flacons de 250 ml stériles contenant 50 ml de bouillon Bennett sont ensemencés par un volume de l'inoculum de chaque isolat pour chaque flacon. Cette opération a été effectuée dans des conditions stériles et avec une incubation à 28°C pendant 7 jours sous agitation permanente et à une vitesse de 120 min/s.

6.3. Extraction des ATB et des huiles brutes

Après la fermentation, une filtration sous vide sur le charbon actif a été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Selon le protocole de **Larpent *et al.* (1989)**, le filtrat a été acidifié par l'acide H₂SO₄ (pH = 2). Le mycélium est recueilli après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation (4000 g) pendant 20 minutes. En présence d'acétate de butyle

qui a été remplacé par l'acétate d'éthyle (V/V), le culot mycélien est égoutté et récupéré dans une fiole et immergé dans du éthanol (100 ml). Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante, après filtration sous vide l'extrait éthanolique est évaporé à sec à 40°C à l'aide d'un rota-vapeur, puis récupéré dans 1 ml de méthanol (fig. 15).

La streptomycine présente dans le filtrat est neutralisée par l'acétate de potassium, ensuite précipitée sous forme de sels de potassium cristallisée dans l'éthanol (V/V) (fig. 16). Les deux extraits aqueux et huileux obtenus vont être ainsi utilisé pour les prochaines manipulations de l'antibiogramme.

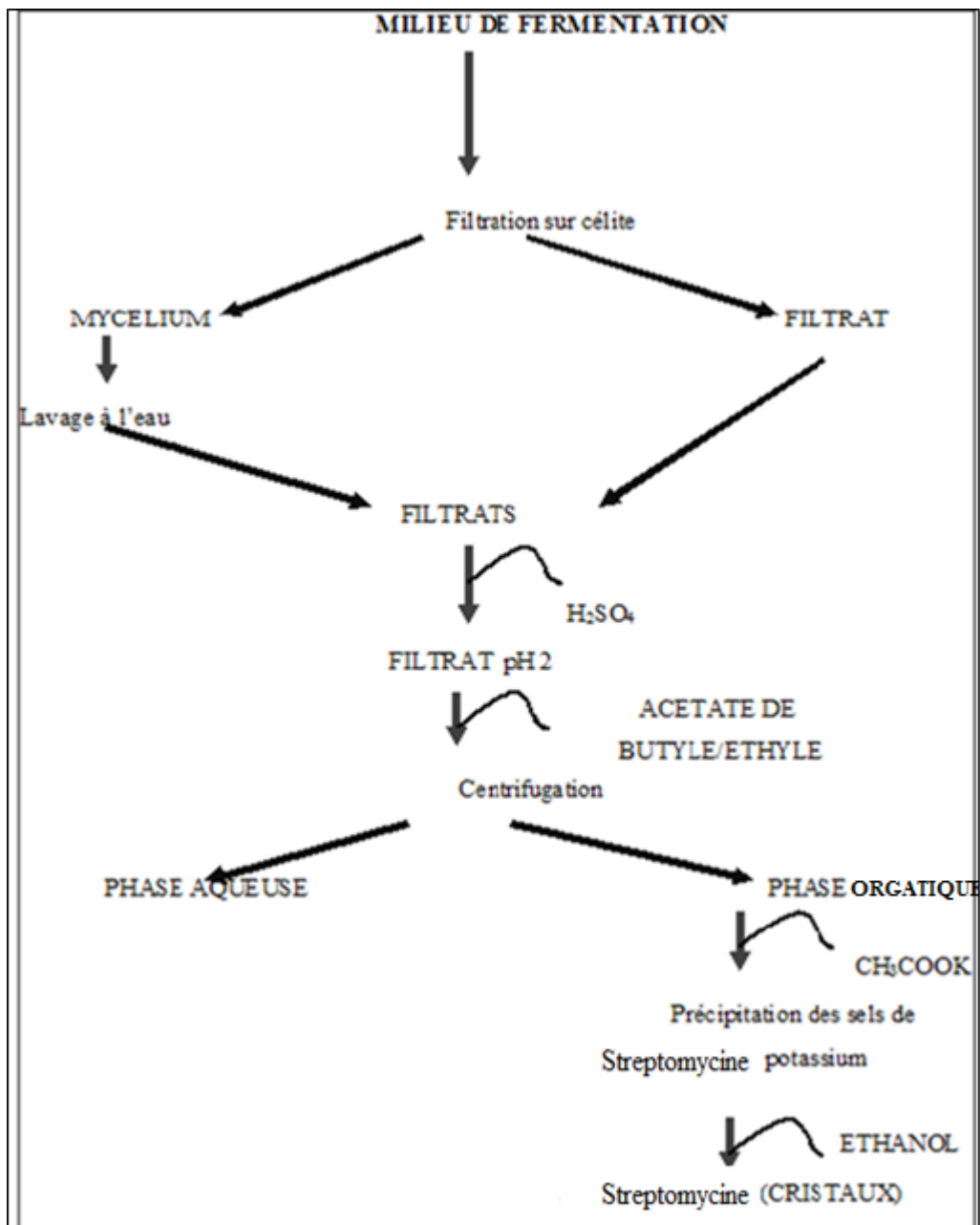


Fig. 16 : Protocole d'extraction des antibiotiques (Larpent *et al.*, 1989).



Fig. 17 : Protocole d'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures.

A : Ampoule à décantation avec les deux phases aqueuse et organique ; **B** : Ampoule à décantation avec la phase organique ; **C** : Centrifugeuse ; **D** : Rota-vapeur

Après, l'épuisement des ATB des différentes phases organiques des isolats de *Streptomyces* sp, ces phases sont récupérées pour une deuxième extraction de la matière grasse (l'huile brute). Cette huile a été séparée du solvant par une distillation au rota vapeur (fig. 17, D).

Remarque : Le nombre de répétition effectué est de deux pour chaque échantillon de souche afin de déterminer le rendement moyen en antibiotique et en l'huile. Le rendement moyen pondéral est calculé selon la formule suivante :

$$R_h = P_2 - P_1$$

- R_h : Rendement en huile ;
- P_2 : Poids du ballon avec l'huile en gramme ;
- P_1 : Poids du ballon vide en gramme ;
- P_E : Poids de la masse d'huile en gramme.

Le rendement en pourcentage de l'huile égal : $R_h = [P_2 - P_1 / P_E] \times 100$

7. Tests de diffusion en milieu solide de l'antibiotique

7.1. Préparation de l'inoculum des souches pathogène

Une préparation des cultures jeunes de *Bacillus subtilis* ATCC6633 Gram positif et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 Gram négatif ont été réalisés sur la gélose nutritif et leurs incubation a été faite à 37°C. Après 16 heures d'incubation une suspension bactérienne a été préparé et analysé par spectrophotométrie UV-visible (**JENWAY**) à une longueur d'onde $\lambda = 600$ nm. La densité optique de chaque suspension bactérienne a été ajustée à DO = 0,8 pour l'utilisation des tests d'antibiogramme des deux extraits.

7.2. Préparation des dilutions des extraits organiques

Des séries dilution des deux extraits (antibiotique et lipide) ont été préparées afin de réaliser les différents tests d'antibiogramme vis-à-vis les souches pathogènes (tab. 14).

Tab. 14 : Séries des dilutions des deux extraits aqueux et organiques.

Dilution	Extrait ATB (μ l)	H ₂ O D (μ l)	Extrait H (μ l)	DMSO (μ l)
0	0	1000	0	1000
1/2	10	990	10	990
1/4	20	980	20	980
1/8	40	960	40	960
1/16	80	920	80	920
1/32	160	840	160	840
1/64	320	680	320	680
ATB : Antibiotique ; H : Huile ; H ₂ O D : Eau distillée stérile ; DMSO : Dimethylsulfoxyde				

7.3.L'antibiogramme

L'antibiogramme d'une souche *Streptomyces* réalisé en milieu gélose Mueller-Hinton par la technique des disques pour déterminer les concentrations minimales inhibitrices et bactériostatique (CMI et CMB). Un volume de 0,1 ml de l'inoculum et ensemencer sur toute la surface du milieu gélose Mueller-Hinton à l'aide d'un écouvillon. Des disques de 6 mm de diamètre sont préparés à l'aide de papier filtre puis stérilisés. Ensuite, ces derniers sont imprégnés de l'extrait à tester (antibiotique et l'huile brute) et placés sur les boîtes espacé (fig. 18).

Après, l'incubation des boîtes à 37°C pendant 20 à 24 heures, les diamètres des zones d'inhibition sont mesurés et enregistrés dans les tableaux.

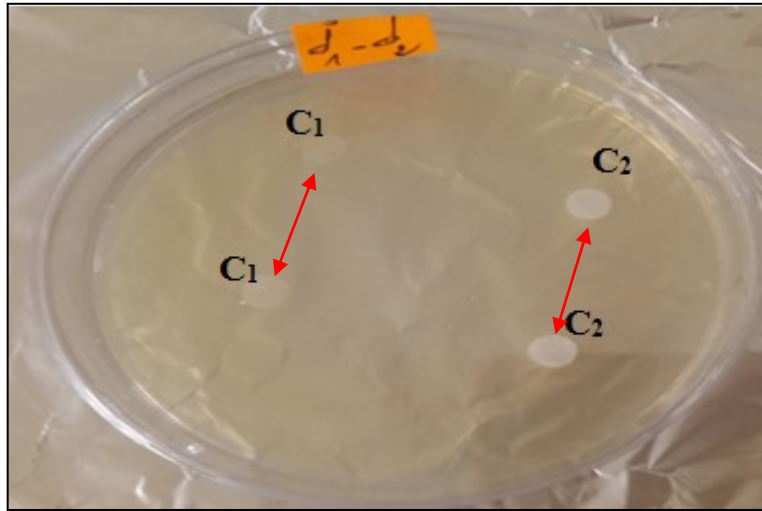


Fig. 18 : Présentation d'une boîte de Pétri avec les disques chargés des extraits.

C1 : concentration de 1^{er} dilution ; C2 : concentration de 2^{eme} dilution

Résultats
et
discussion

IV. Résultats et discussion

1. Isolement des actinobactéries

Après de 7 jours d'incubation à 30°C sur des milieux à base d'amidon, les colonies caractéristiques des actinomycètes apparaissent. Ce milieu a donné des meilleurs résultats, et d'après les données bibliographiques l'amidon présente une source de carbone favorable à la culture des actinomycètes (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

Les caractéristiques morphologiques (macros et microscopiques), des souches d'actinobactéries sont largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes comme les *Streptomyces* sp. Les étapes de l'isolement et la purification à permet l'obtention d'environ onze souches d'actinomycètes. À partir des quelles quatre sont sélectionnées sur la base de leurs caractères morphologiques, afin, de les utilisés dans la production des antibiotiques et des fractions lipidiques (**fig. 19**).

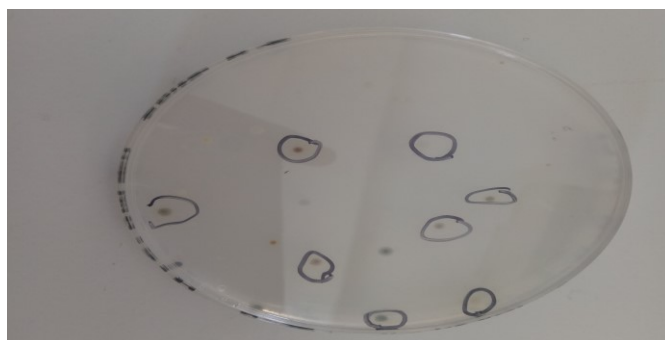


Fig. 19 : Les souches d'actinomycètes isolés sur milieu amidon-caséine.

2. Caractérisation macroscopiques

D'après les caractéristiques macroscopiques de l'atlas des actinobactéries, les descriptions sont faites pour les différentes souches isolées pour caractériser les genres des actinomycètes.

Les caractères macroscopiques de ces souches d'actinomycètes présentent des formes des couleurs et des textures différentes (**tab.15 et fig. 20**).

Tableau 15: Aspect macroscopique des souches actinomycètes sur le milieu caséine amidon.

Souche	Taille	Forme	Croissance	Pigmentation	
				Mycélium aérien	Mycélium végétatif
A 3	Petite	Bombé Ronde	Moyenne	Gris verdâtre	Vert foncé
A 10	Petite	Bombé	petite	Beige foncé-blanc	Marron
A 11	Petite	aplaté	Moyenne	Gris	Marron foncé
A 12	Moyenne	Ronde	Bonne	Gris-blanc	Marron

Les souches d'actinomycètes produisent des pigments diffusibles de différentes couleurs sur le milieu de culture. D'après **Kämpfer (2006)**, les pigments des *Streptomyces* sont dominés par le pigment mélanoïdes. Il apparaisse le plus souvent par une couleur marron, qui dépend dans la plupart des cas des conditions de culture et surtout de la composition du milieu d'isolement. Les résultats obtenus sont similaires, où on a bien noté la production des pigments diffusibles sur et dans le milieu. On a enregistré une couleur du mycélium du substrat différente de celle du mycélium aérien pour les différentes souches (**fig. 20**).

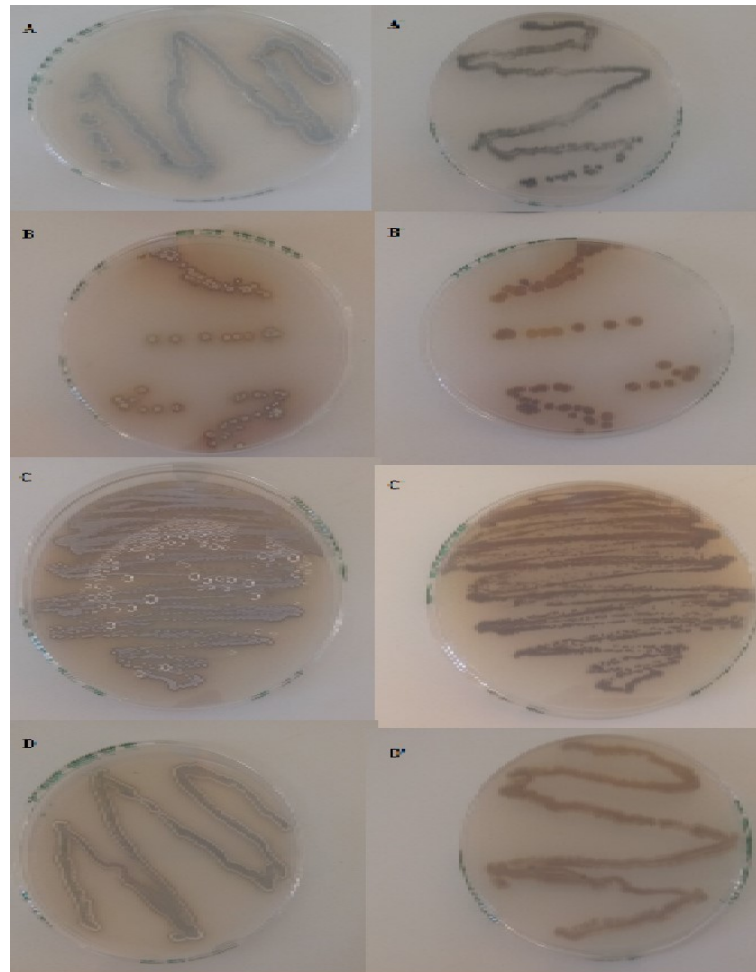


Fig. 20: Observation des pigmentations des (substrat et aérien) des isolats d'actinobactéries.

(A et A' : MA et MS souche A3 ; B et B' : MA et MS souche A10 ;

C et C' : MA et MS souche A11 ; D et D' : MA et MS souche A12

MA : Mycélium Aérien ; MD : Mycélium Substrat).

3. Caractérisation microscopiques

Après la coloration de Gram, des différents isolats d'actinomycètes, les observations microscopiques (100×G) des 4 souches sont représentées dans la figure ci-dessous.

Ces observations montrent que les souches d'actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à coloration de Gram positive. Les 4 isolats présentent un mycélium du substrat non fragmenté et

un mycélium aérien sous forme de filaments fins, ramifiés sur les milieux solides qui se terminent par des chaînes de spores portés par des sporophores de différentes formes (**fig. 21**).

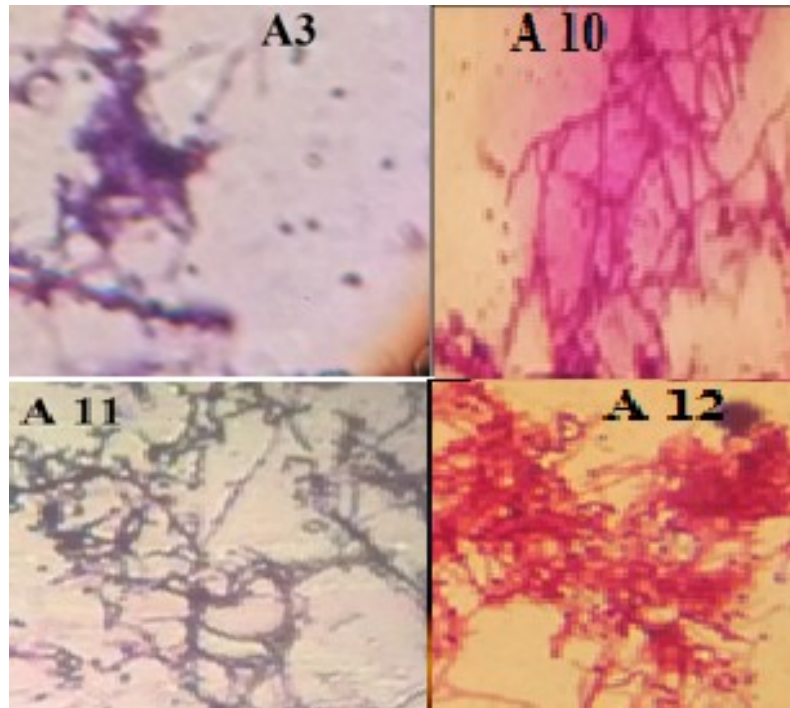


Fig.21 : Observation du mycélium aérien des s'isolat au microscope optique G (x100).

Les observations microscopiques montrent une morphologie des mycéliums aériens typiques des actinobactéries. En effet, les aspects morphologiques confirment le genre des *Streptomyces*. La présence des colonies irrégulières de surface pulvérulente grandes et colorées. Les mycéliums aérien et du substrat sont très évoluées, complexes et persistants. Les hyphes du mycélium aérien ramifié portant des sporanges droits ou flexueux. Le mycélium du substrat quant a lui est long, non fragmenté et ne portant pas des spores. Les travaux de **Locci et al. (1989)**, **Thakur et al. (2007)**, **Muiru et al. (2008)** et **Bergey's (2012)**, entreprises sur les caractérisations morphologiques microscopiques relatent les mêmes résultats observés avec les différents isolats. Ainsi que, les milieux de culture utilisés pour l'identification des actinobactéries n'ont pas d'impact sur les caractères morphologiques, mais plutôt sur les caractéristiques physiologiques comme la production de pigments mélanoides et spécialement sur le milieu caséine amidon.

4. Étude des caractéristiques physiologiques et biochimiques

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques des souches sont rassemblés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 16 : caractéristiques physiologiques et biochimiques des quatre souches

Caractéristiques / Souches	TM	A3	A10	A11	A12
Hydrolyse de la caséine	-	+	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon	-	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	-	+	+	+	+
Réduction des nitrates	-	+	+	+	+
Production d'H ₂ S	-	-	-	-	-
Fermentation du glucose	-	-	-	-	-
Fermentation lactose/ saccharose	-	-	+	+	-
Recherche de Catalase	-	+	+	+	+
Dégradation de l'urée	-	-	-	-	+
L'utilisation de citrate	-	+	+	-	+
Lécithine	-	+	+	+	+
Les fermentations intermédiaires	VP	-	+	+	+
	RM	-	-	-	-

TM : Témoin ; (+) : Test positif ; (-) : Test négatif ; VP : Vogues Prauskouer ; RM : Rouge méthyl

4.1. Hydrolyse de l'amidon

Toutes les souches isolées dégradent l'amidon, l'absence de coloration bleue autour des colonies traduit une synthèse extracellulaire des α -amylase diffusés dans le milieu. A l'inverse, dans les autres zones du milieu où l'extension bactérienne est absente, la couleur du réactif Lugol a viré vers le bleu, indiquant la présence de l'amidon (**fig. 22**). Les mêmes résultats ont été obtenus et décrits sur les *Streptomyces* sp par plusieurs équipes (**Demain et Solomon, 1985 ; Sanglier et al., 1993**).

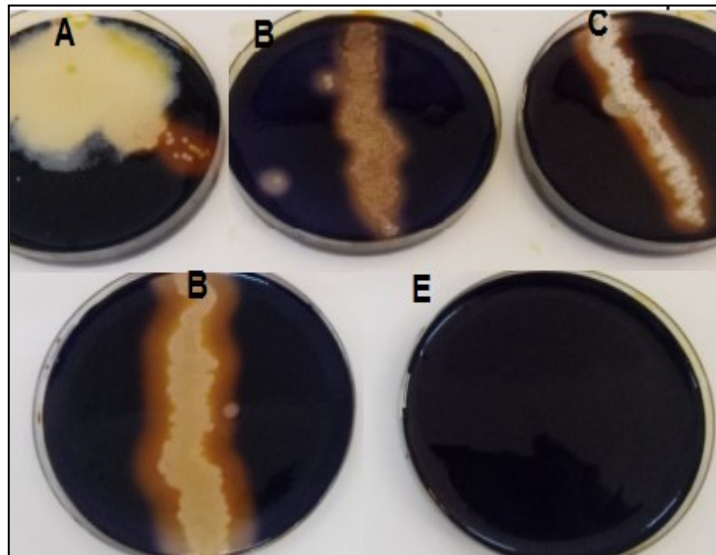


Fig. 22 : Test d'hydrolyse positif de l'amidon par les quatre isolats des *Streptomyces sp.*

A : souche A3 ; **B :** souche A10 ; **C :** souche A11 ; **D :** souche A12 ; **E :** Boite témoin

4.2. Hydrolyse de la gélatine

Le test est positif pour toutes les souches, on a constaté une dégradation de la gélatine autour des cultures. Ce résultat se traduit par la présence des zones claires correspondant aux zones d'hydrolyses, qui est due à la présence de l'enzyme gélatinase sécrétée et diffusée dans le milieu par les *Streptomyces sp* comparativement au milieu gélatineux de la boîte témoin (**fig. 23**).

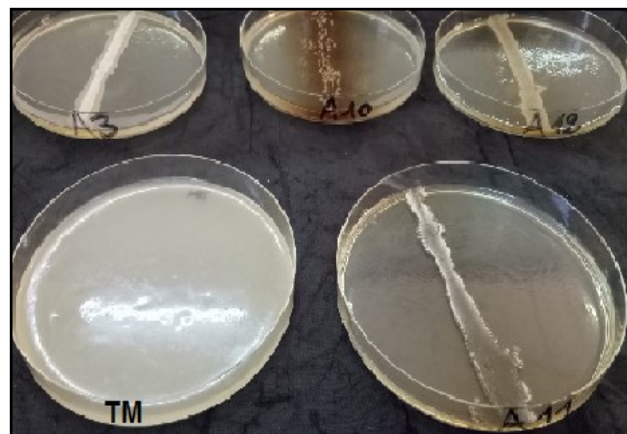


Fig.23 : Test d'hydrolyse positif de la gélatine par les quatre isolats des *Streptomyces sp.*

Cependant, beaucoup de travaux ont été réalisés sur les *Streptomyces sp* et confirment les potentialités de ce genre à dégrader certains substrats et déchets par leurs enzymes gélatinases spécifiques (**Bergey, 2012**).

4.3. Hydrolyse de la caséine

Après l'incubation des souches pendant 7 jours sur la caséine, les résultats est positif pour toutes les souches. La figure montre la présence des zones claires autour des cultures comparant avec le milieu de la boîte témoin. Cette dégradation de caséine est due à la présence de l'enzyme caséinase sécrété par les quatre isolats de *Streptomyces* sp.



Fig. 24 : Test d'hydrolyse positif de la caséine par les quatre isolats des *Streptomyces* sp.

Plusieurs manuels des classifications confirment que le genre *Streptomyces* sp sont capables d'hydrolysées la caséine. Cette capacité de sécrétion, dépend de plusieurs facteurs intrinsèques et extrinsèques des espèces (Bergey's, 2012).

4.4. Teste de Réduction de nitrate

La figure ci-dessous montre que le test des nitrates est positif en présences de la souche A3 de *Stréptomyces* sp. Par contre avec les souches A10, A11, A12 la couleur du milieu n'a pas changé en présence des réactifs NR1 et NR2 et même après l'ajouté la poudre de Zn.

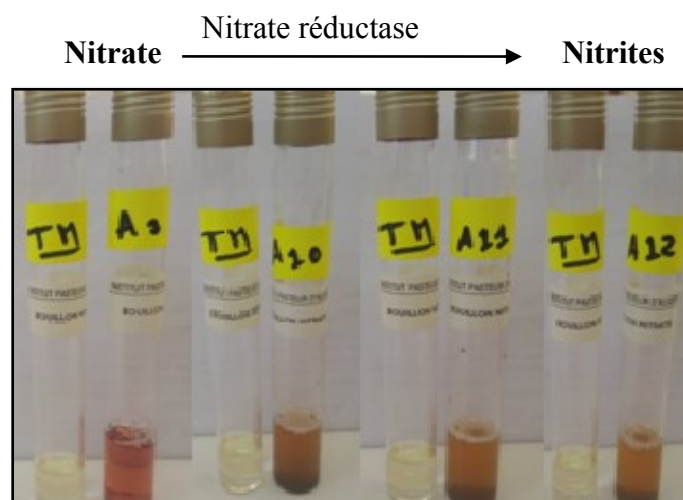


Fig. 25 : Tests de réduction de nitrate par les quatre isolats des *Streptomyces* sp.

4.5. Recherche de Catalase

L'examen de la recherche de la catalase, montre que les isolats A 3, A10, A11, A12 sont de catalase positive (apparition de bulles d'air) (**fig. 26**). D'après **Tortora *et al.*, (2003)**, la catalase c'est une enzyme oxydoréductase qui catalyse la peroxyde d'hydrogène en eau et dioxygène.

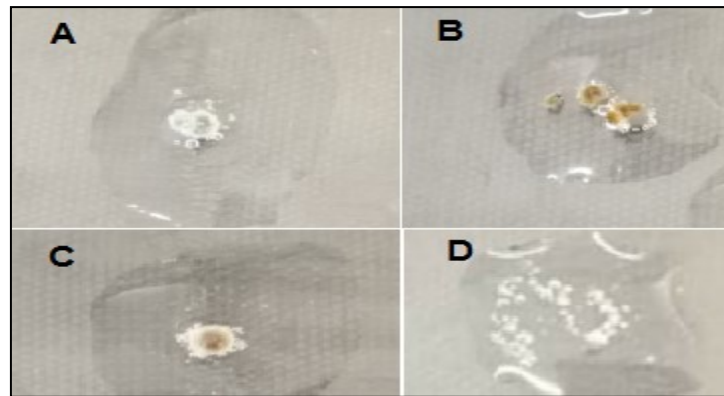


Fig. 26 : Test positif avec tous les isolats.

A : souche A3 ; **B :** souche A10 ; **C :** souche A11 ; **D :** souche A12

4.6. Hydrolyse de lécithine

La figure montre que les souches A3, A10, A11 et A12 possèdent l'enzyme lécithinase qui leur a permis de dégrader la lécithine. Cette activité se traduit par la présence d'un halo opaque, blanc perlé sa limite.

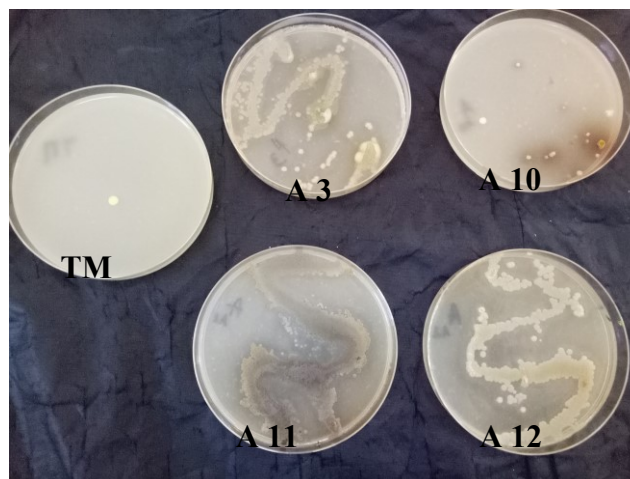


Fig. 27 : Test de l'activité lécithinolytique des quatre isolats des *Streptomyces sp*

4.7. Dégradation de l'urée

Les souches A3, A10, A11 ont dégradé l'urée du milieu, par une transformation et production de dioxyde de carbone et d'ammoniac. Ce dernier alcalinise le milieu et par le virage de sa couleur

en rouge (milieu basique) (**fig.28**). Par contre la souche A12 n'a pas la capacité de synthétiser l'uréase.

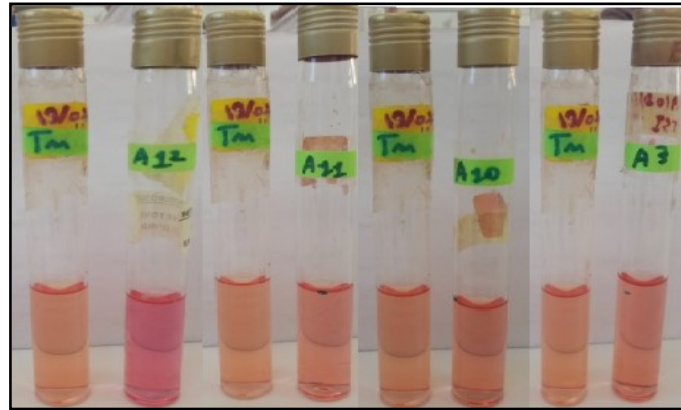


Fig. 28 : Résultats du test de l'urée par les quatre isolats des *Streptomyces sp*

4.8. L'utilisation de citrate

Les souches A3, A10, A12, utilise le citrate de Simmons comme une source de carbone car la couleur du milieu a virée vers le bleue, à l'exception de la souche A11 qui n'a pas utiliser le citrate (**fig. 29**).

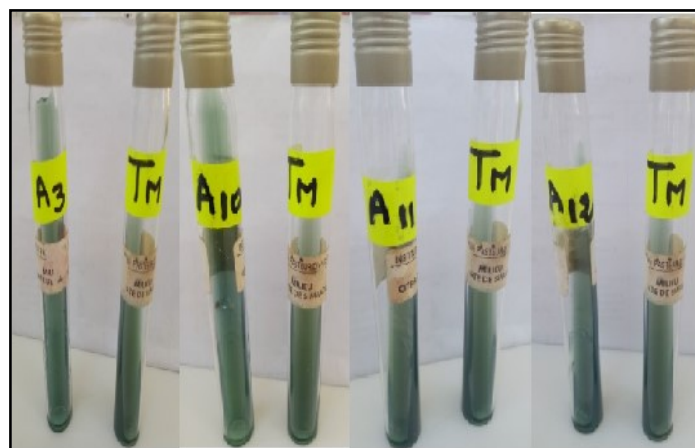


Fig. 29 : Présentation de résultat de citrate par les quatre isolats des *Streptomyces sp*

4.9. Les réactions VP et RM

Les tests de VP sont positifs car la couleur de milieu est changée vers le marron. Alors que pour les résultats de RM sont négatif car de milieu virer vers le jaune. Les même résultats sont obtenu par **Pathalam et al, (2017)**.



Fig.30: Présentation le résultat des réactions VP et RM par les quatre isolats des *Streptomyces sp*

4.10. Utilisation des différents substrats carbonés et production de H₂S

Dans la littérature, l'utilisation de l'un des sucres contenus dans le milieu se traduit par une acidification (virage au jaune du rouge de phénol). La gélose TSI fournit trois renseignements principaux présentés dans le tableau suivant :

Tableau 17 : Résultats d'utilisation des différents substrats carbonés et production de H₂S.

Souches	Résultats des tests recherchés			Lecteur des résultats
	Glucose	Lactose/Saccharose	H ₂ S	
A 3	-	-	-	-le culot et la pente inclinée est de couleur rouge (couleur inchangé) - Absence de noircissement
A 10	-	+	-	-le culot est de couleur rouge et Pente inclinée jaune - Absence de noircissement
A 11	-	+	-	-le culot est de couleur rouge et Pente inclinée jaune - Absence de noircissement
A 12	-	-	-	-le culot et la pente inclinée est de couleur rouge - Absence de noircissement

Les résultats montrent que les quartes souches n'ont pas fermenté le glucose et n'ont pas produise de la sulfure d'hydrogène, et sur l'ensemble des quartes isolats deux souche (A10 et

A11) fermentent le lactose et saccharose. Tandis que la souche A3 et A12 ne sont pas des fermentateurs de lactose et de saccharose (tab. 17, fig. 31).

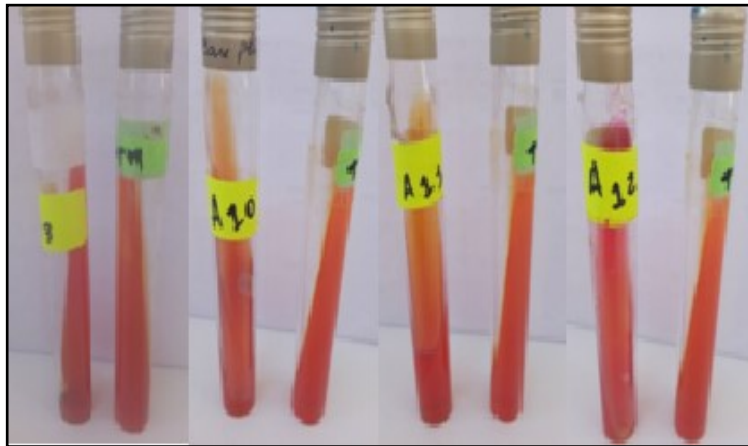


Fig. 31: Le test de l'activité de fermentation des sucres et production de H₂S par les quatre souches *Streptomyces sp.*

D'après l'étude physiologique, il est impossible d'attribuer ces souches à des espèces actinomycétales types sans le recours à la taxonomie numérique et à l'application de tests statistiques. Toutefois, ces tests restent intéressants car ils indiquent certaines caractéristiques physiologiques biochimiques importantes peuvent être utiles pour la sélection de ces isolats. Ainsi, les quatre isolats qui ont fait l'objet d'une étude morphologique, chimique et physiologique (limitée), il est donc difficile à ce stade d'étude de confirmer l'espèce des différentes souches de *Streptomyces sp.*

5. Fermentation submergée

La fermentation est effectuée sur milieu Bennett liquide pendant 8 jours en présence des isolats d'actinomycètes. On a observé à l'œil nu que la masse microbienne à augmenter à partir du 2^{ème} jours pour l'ensemble des souches d'actinomycètes (A3, A10, A11, A12). Mais, il reste que la biomasse microbienne pour ces isolats est très variable, cette évaluation approximative pourra être expliqué par la une variation de la phase exponentielle de la fermentation de chaque isolats.

Selon Buchanan, (1918); Weihua et Zhongjun, (2011) ; Laurent et al. (2012) ; Xiaohui et al. (2012) et Leena et al. (2013), l'évolution de la masse microbienne augmente en fonction du temps, elle passe par trois phases : la phase d'adaptation des microorganismes (latence) ; la phase exponentielle (production des métabolites) ; la phase stationnaire et la phase décline.

6. Les rendements en poids des extractions d'ATB et de l'huile

6.1. Les rendements des extractions d'ATB

La figure 32 exprime les résultats de l'utilisation des différents isolats de *Streptomyces sp* pour produire les ATB. On a remarqué que la souche A3 présente le pourcentage le plus élevé des ATB 0,26 g. Concernant, les souches A 10, A11 et A12 leurs taux sont faibles par rapport aux isolats A3.

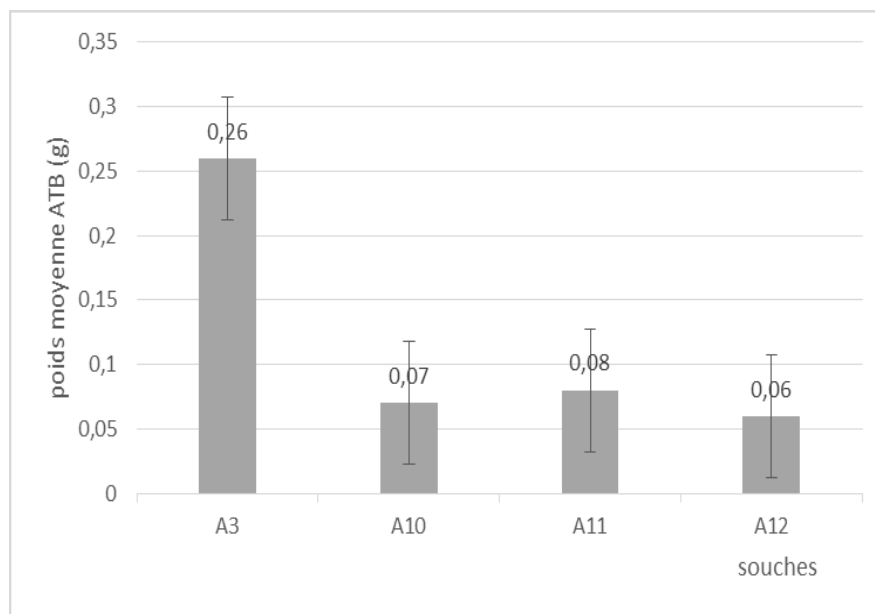


Fig. 32 : Les rendements moyens en poids des ATB des isolats de *Streptomyces sp*.

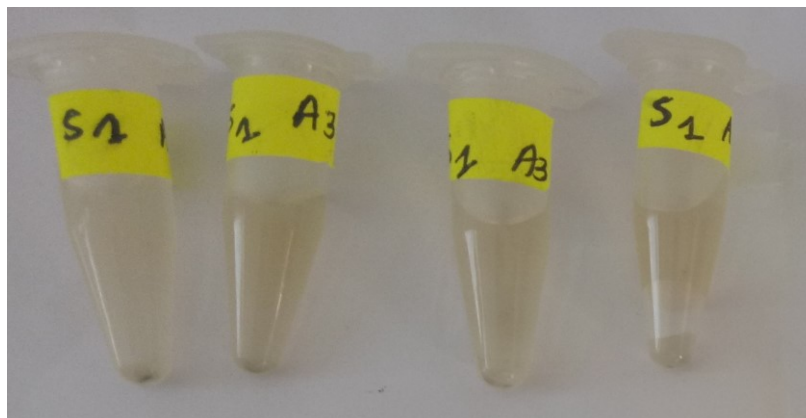


Fig. 33 : Extrait aqueux en ATB produit par la souche A3.

6.2. Les rendements de l'huile

Les mêmes phases organiques qui ont été épuisées des ATB, sont récupérées pour l'extraction des huiles brutes à l'aide d'un rota-vapeur. Après cette opération, les rendements

des huiles en poids sont déterminés pour les différents isolats de *Streptomyces sp* (A3, A10, A11, A12) et présentés dans la figure 34.

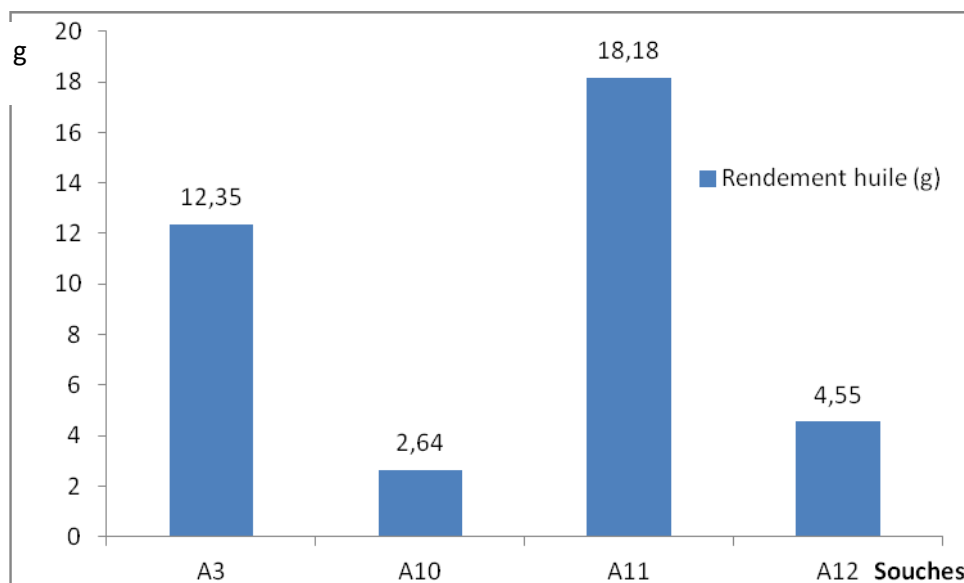


Fig. 34 : Les rendements moyens en poids des huiles brutes des isolats de *Streptomyces sp*. Toutefois, les huiles brutes des souches de *Streptomyces sp* présentent des rendements dix fois plus élevés par rapport aux rendements des ATB (**fig. 33 et 34**). On a remarqué que les valeurs pondérales des huiles sécrétés par les souches A3 et A10 sont plus élevées (12,35 g et 18,18 g) respectivement (**fig.34**).

Toutes les huiles des souches présentent une couleur jaune foncé à l'exception de la souche A3 dont la couleur de son l'huile est jaune limpide (**fig. 35**). L'huile présente une odeur légère et un aspect moins visqueux.

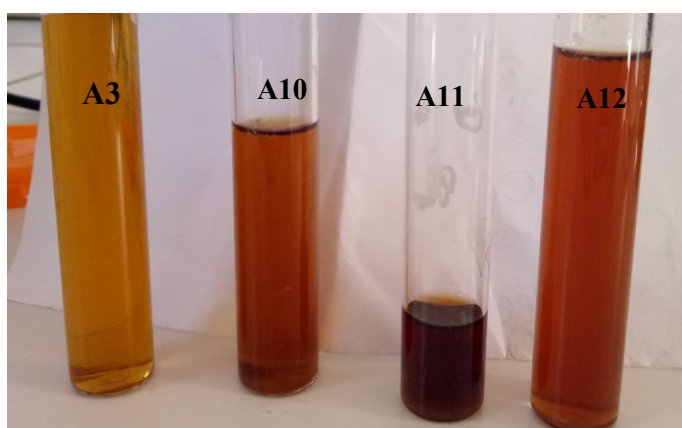


Fig. 35 : Couleur des huiles brutes de *Strptomyces sp*. (Couleur jaune A3, Couleur jaune foncé A10, A11, A12)

De même, les souches A11 et A12 présentent des rendements pondéraux en huiles qui restent intéressants. Les résultats obtenus prouvent que les *Streptomyces sp* au cours de la fermentation synthétisent les ATB à des faibles quantités et en même temps d'autres métabolites primaires tels que les huiles avec des quantités importantes. À défaut de l'indisponibilité des documents de références, la comparaison des résultats obtenus n'ont pas été établie.

Cependant, plusieurs auteurs confirment que les microorganismes peuvent synthétiser non seulement les métabolites secondaires comme les ATB, mais aussi, des métabolites primaires tels que les glucides et lipides (Prescott *et al.*, 2010)

7. Test antibiogramme des deux extraits (ATB et l'huile)

Les résultats de l'activité antibactérienne des ATB et des huiles de *Streptomyces* vis-à-vis les bactéries pathogènes utilisées sont résumés en l'annexe III. L'activité des extraits étudiés de *Streptomyces* a été évaluée par la présence ou l'absence d'inhibition de la croissance bactérienne. Les tableaux 18 et 19 indiquent les résultats obtenus des deux extraits aux différentes concentrations sur les souches bactériennes de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis*.

Tableau 18 : Moyennes de diamètres des zones d'inhibitions (en cm) des extraits d'ATB *Streptomyces* de vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *B. subtilis*

Extrait 1 / souche A3							
[C] Duitions (g/l)	0,00	0,0005	0,001	0,002	0,004	0,008	0,016
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,80±0,20	0,75±0,05	1,05±0,05	1,25±0,10	1,10±0,00	1,05±0,05
DZI <i>B. subtilis</i>	0,00	0,95±0,15	1,45±0,35	1,10±0,10	1,05±0,15	1,40±0,00	1,00±0,10
Extrait 2/souche A10							
[C] Duitions (g/l)	0,00	0,00014	0,00028	0,00056	0,00112	0,00224	0,00448
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0,00	1,15±0,05	0,90±0,10	1,10±0,00	1,25±0,00	1,10±0,05	1,60±0,00
DZI <i>B. subtilis</i>	0,00	1,05±0,05	1,10±0,20	1,00±0,00	1,20±0,00	1,00±0,00	1,40±0,00
Extrait 3 /souche A11							
[C] Duitions (g/l)	0,00	0,00016	0,00032	0,00064	0,00128	0,00256	0,00512
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,75±0,00	0,80±0,00	0,85±0,15	1,00±0,05	1,10±0,20	0,85±0,10
DZI <i>B. subtilis</i>	0,00	1,35±0,05	1,20±0,20	1,10±0,10	1,05±0,05	1,15±0,05	1,10±0,10
Extrait 4/ souche A12							
[C] Duitions (g/l)	0,00	0,00012	0,00024	0,00048	0,00096	0,00192	0,00384
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0,00	0,70±0,20	0,85±0,05	0,95±0,10	0,90±0,35	1,00±0,00	1,00±0,30
DZI <i>B. subtilis</i>	0,00	1,40±0,10	1,20±0,00	1,10±0,00	1,30±0,10	1,65±0,15	1,55±0,15
[C] : concentration exprime en g/l ; DZI : diamètre zone inhibition exprime en cm.							

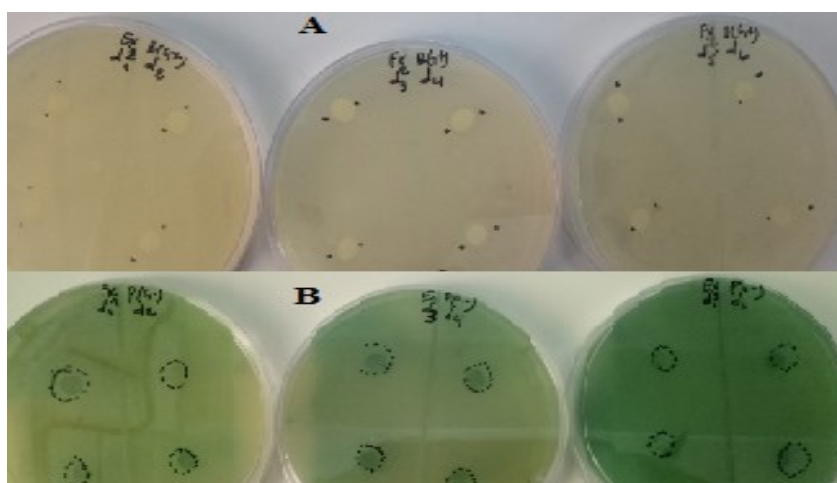


Fig. 36 : Tests d'antibiogramme des extraits d'ATB vis-vis les deux souches.

A : *Bacillus subtilis* ; B : *Pseudomonas aeruginosa*

Les résultats des tests d'antibiogramme des extraits d'ATB présentent un spectre d'activité antibactérienne importante. Des zones claires avec des bordures distinctes apparaissent autour des disques comme elle indique **la figure 36**. Les diamètres des zones (halos) varient selon la souche testée, et en fonction de la nature et la dose de la substance active présente dans les extraits (**tab. 18**). D'après **Orhan et al., (2012)**, l'activité antibactérienne peut être exprimé, selon quatre niveaux d'activité :

- $D < 8$ mm : bactérie non sensible ;
- $9 < D < 14$ mm : bactérie sensible ;
- $15 < D < 19$ mm : bactérie très sensible ;
- $D > 20$ mm : bactérie extrêmement sensible.

➤ **Antibiogramme des ATB testée sur les deux souches pathogènes**

Les résultats révèlent que l'extrait ATB de *Streptomyces sp* ont un effet antibactérien considérable sur la souche *P. aeruginosa*. Les zones d'inhibition et degrés de sensibilité sont de l'ordre croissant avec, selon les concentrations de l'extrait ATB (**tab. 18**). Ces diamètres varient entre $0,70 \pm 0,20$ à $1,60$ cm et la zone d'inhibition la plus large est enregistrée à la concentration de $0,016$ g/l avec un diamètre de $1,60$ cm. La CMI de l'extrait ATB correspondant la plus petite concentration, elle est approximativement de $0,0012$ g/l.

Cependant, les diamètres des inhibitions vis-à-vis la souche *Bacillus subtilis* varient entre $0,95 \pm 0,15$ à $1,65 \pm 0,15$ cm et la zone d'inhibition la plus grande est de $1,65 \pm 0,15$ cm avec une concentration de $0,00192$ g/l. La CMI correspond à la plus faible concentration qui est de $0,0005$ g/l (**tab. 18**).

En remarque que la souche bactérienne *B. subtilis* est très sensible vis-à-vis des fractions de l'extrait d'ATB, par contre *P. aeruginosa* est moins sensible aux extrait. Cela est dû bien évidemment à la composition des parois des deux souches. *P. aeruginosa* s'est montré plus résistante car elle est de Gram négatif qui signifie que sa paroi de nature polysaccharidique est moins perméable aux agents antimicrobiens.

➤ **Antibiogramme des Huiles testée sur les deux souches pathogènes**

Tableau 19 : Moyennes de diamètres des zones d'inhibitions (en cm) des extraits huileux de vis-à-vis *Streptomycète* de *P. aeruginosa* et *B. subtilis*

Extrait 1 / souche A3							
Volume (ul)	0	10	20	40	80	160	320
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0	1,25±0,05	1,30±0,10	1,05±0,15	0,75±0,05	1,10±0,10	1,30±0,00
DZI <i>B. subtilis</i>	0	0,80±0,00	0,75±0,05	1,05±0,25	1,25±0,05	1,10±0,10	1,05±0,05
Extrait 2 / souche A10							
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0	0,85±0,15	0,80±0,10	0,85±0,05	0,95±0,05	1,00±0,00	1,05±0,25
DZI <i>B. subtilis</i>	0	1,15±0,25	0,90±0,10	1,10±0,20	1,25±0,05	1,10±0,10	1,60±0,10
Extrait / souche 3 A11							
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0	0,90±0,10	0,95±0,05	1,00±0,10	0,85±0,05	1,00±0,10	1,25±0,05
DZI <i>B. subtilis</i>	0	0,80±0,10	0,85±0,05	1,00±0,20	1,10±0,10	0,75±0,05	0,85±0,05
Extrait / souche 4 A12							
DZI <i>P. aeruginosa</i>	0	0,90±0,10	0,65±0,05	0,85±0,05	0,90±0,10	1,00±0,00	1,10±0,20
DZI <i>B. subtilis</i>	0	0,70±0,00	0,85±0,15	0,95±0,15	1,00±0,00	0,90±0,10	1,00±0,10
DZI : diamètre zone inhibition exprime en cm							

Les résultats des huiles ont des effets antibactériens étendus sur la souche *P. aeruginosa* les zones d'inhibitions sont de l'ordre croissant avec des degrés de sensibilité différents selon les concentrations des huiles. Les diamètres des inhibitions varient entre **0,65± 0,05** à **1,30± 0,00** cm. Toutefois, la CMI de l'extrait vis-à-vis cette souche est estimée entre 20 à 40 µl.

En ce qui concerne la souche *B. subtilis* les résultats révèlent que l'extrait huileux de *Streptomyces sp* exerce un effet antibactérien considérable. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus sont différents, où on a noté une variation de sensibilité selon les concentrations de l'extrait. Les diamètres des inhibitions varient entre **0,70** à **1,60± 0,10** cm. La CMI de l'extrait vis-à-vis cette souche est estimée entre 10 µl à 20 µl.

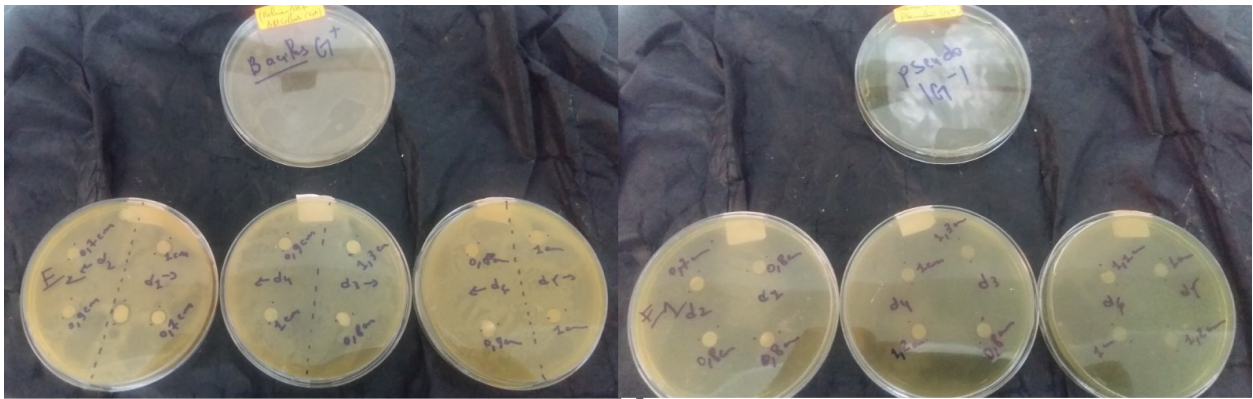


Fig. 37 : Tests d'antibiogramme des extraits huileux.

En comparant la sensibilité des différentes souches vis-à-vis des huiles et les ATB testées, nous constatons que ces extraits diffèrent d'une bactérie à une autre. Les extraits testés inhibent la croissance de *Pseudomonas aeruginosa* et *Bacillus subtilis* à partir des concentrations de 0,001g/l. *Bacillus subtilis* s'est montré très sensible, comparant avec *Pseudomonas aeruginosa*. Ce résultat obtenu est probable dû à la composition différente de leurs parois et la capacité de diffusion des composés actifs présents dans les deux extraits huileux et les ATB. Chez les bactéries à Gram négatif, la membrane externe constitue une barrière lipopolysaccharide imperméable. Cette composition est absente chez les bactéries à Gram positif. C'est pour cette raison, elles sont plus sensibles, car elles sont moins protégées contre les agents antibiotiques d'origine des *Streptomycètes sp* comme la streptomycine (Hogan et Kolter 2003 ; Nikaido, 2003).

Conclusion
et
Perspectives

Conclusion et perspectives

Les résultats montrent que l'aspect macroscopique des actinomycètes confirme le genre *Streptomyces* sp. Les quatre isolats présentent des colonies de tailles différentes petite, moyenne et grande et leurs diamètres varient de 2 à 5 mm. La forme est variable lisse, bombé, aplatie etc., possédant un mycélium végétatif surmonté d'un mycélium aérien de couleurs différentes (jaune, blanche, marron, beige, verdâtre, brun etc.). Les observations microscopiques des cellules des différents isolats révèlent une coloration de Gram positif.

Les tests biochimiques et physiologiques montrent que les isolas hydrolyse plusieurs composé tel que amidon, caséine, gélatine, lécithine...etc, à l'exception hydrolyse de urée, production de H₂S et fermentations des glucides qui sont négative.

Les rendements des extraits des souches (A3, A10, A11, A12) en ATB et en huiles sont de (0,26 ; 0,08 ; 0,07 g et 0,06 g) et (18,18 ; 12,35 ; 4,55 et 2,64 g) respectivement.

Les résultats révèlent que les extraits d'ATB et des huiles de *Streptomyces* sp ont un effet antibactérien considérable sur les souches *P. aeruginosa* et *Bacillus subtilis* avec des zones d'inhibition et des degrés de sensibilité qui sont de l'ordre croissant selon les concentrations des extraits. Ces diamètres varient entre [(0,70 ± 0,20 à 1,60 ± 0,00 cm) et (0,15 à 1,65 ± 0,15 cm)] et [(0,65 ± 0,05 à 1,30 cm) et (0,70 à 1,60 ± 0,10 cm)] respectivement pour les souches *P. aeruginosa* et *Bacillus subtilis* et les deux extraits ATB et les huiles.

Les CMI des extraits ATB et huileux obtenus vis-à-vis les mêmes souches *P. aeruginosa* et *B. subtilis* correspondent respectivement aux concentrations et aux volumes (0,0012 g/l ; 0,0005 g/l) et (20 à 40 µl ; 10 à 20 µl).

Il est préférable d'approfondir cette étude par d'autres méthodes telles que la caractérisation des extraits par la technique HPLC et CPG. Ainsi que, l'identification des différentes souches par les techniques de la biologie moléculaire est nécessaire pour une meilleur caractérisation des souches d'actinomycètes et exploitation.

Références
bibliographiques

Référence

1. **Amin Hasani., Ashraf Kariminik., Khosrow Issazadeh., (2014).**Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities, Issue 1, Volume 2,: 63-75
2. **Anderson Annaliesa. S & Wellington Elizabeth M. H (2001)**, The taxonomy of *Streptomyces* and related genera, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 51 : P 797–814.
3. **Andriambololona T., (2010).** Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d’Ankafobe. P5-10.
4. **Archambaud. M., (2009).** Laboratoire Bactériologie-Hygiène .CHU Rangueil Toulouse. P 23, 24, 33,34.
5. **Avril J. L. ,(1992).** Bactériologie clinique.2 éd. Paris : ellipses. Pp: **511**.
6. **Baltz, R.** “Antimicrobials from Actinomycetes : Back to the Future.” *American Society for Microbiology*,Microbe, 2, no. 3 (2007) : 125–31.
7. **Belyagoubi Larbi. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de doctorat. Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, P 143.
8. **Benson D. R.; Silvester W. B., (1993).** Biology of Frankia strain, actinomycetes symbiont of actinorrhizal plants. *Microbiological Review.*, (57):293-319.
9. **Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P,Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki., (2012).** Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology.). Parte A (Eds). vol 5:The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. 1750 p.
10. **Blondeau J. Fluoroquinolones (2004).** Mechanism of action, classification, and and development of resistance. Survey of ophthalmology. Vol 49 .
11. **Bradbury J. F., (1986).** Guide to plant pathogenic bacteria. London, CAB International Mycological Institute Publisher.
12. **Bridier A, Le Coq D, Dubois-Brissonnet F, Thomas V, Aymerich S, Briandet R., (2010).** ; The spatial architecture of *Bacillus subtilis* biofilms deciphered using a surface-associated model and in situ imaging. *PLoS One*. 2011 Jan 18; 6(1):e16177. Epub 2011 Jan 18.
13. **Buchanan, R.E., (1918).** Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273.in Jean-Christophe Augustin ThèseModélisation de la croissance microbienne
14. **Burt, S (2004).** Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods –a review. *Internatinal Journal Food Microbiology* 94 223-253

Référence bibliographique

15. **Camille D., (2007).** Microbiologie pratiques pour le laboratoire d'analyse et de contrôle sanitaire. Lavoisier. 126-173.
16. **CCE. (2001).** Commission des Communautés Européennes: propositions de la commission en matière de lutte contre la résistance antimicrobienne. Bruxelles, vol 885
17. **Chaker H., (2012)** .Regulation de l'adaptation de la bacterie *Pseudomonas aeruginos* a son hôte : implication des metabolites du tryptophane.
18. **Chaphalkar S.R. et Dey S., (1996)** Computer assisted identification of *Streptomyces* species with high extracellular protease activity. *Actinomycete*. 7(2): 47-54.
19. **Chen W., and Zhongjun Q., (2011).** Development of a gene cloning system in a fast growing and moderately thermophilic *Streptomyces* species and heterologous
20. **Collins RA. , (1995)** A subunit interface mutant of yeast pyruvate kinase requires the allosteric activator fructose 1,6-bisphosphate for activity. *Biochem J* 310 (Pt 1):117-23
21. **Delarras C., (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
22. **Delarras, C. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire.
23. **Delaunay S, Rondags E et Germain P., (2003),** production d'antibiotiques par biotechnologies, techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, *génie de la réaction chimique* J6 008 : P 1-12.
24. **Denyer S.P, Hodges N.A, Gorman S.P., (2004).** Hugo and Russell's Pharmaceutical Microbiology. 7ème Edition Blackwell Science. ISBN 0-632-06467-6. development of resistance. Survey of ophthalmology. Vol 49.
25. **Djaballah, C., (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 73 p.
26. **Dommergues Y. ; Mangenot F., (1970).** Ecologie microbienne du sol, Masson et Cie. France.
27. **Doumbou C. L.; Akimov V.; Beaulieu C., (1998).** Selection and characterization of microorganisms utilizing Thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. Applied Environment Microbiological., (64): 4313-4316.
28. **Dworkin Martin, Falkow Stanly, Rosenberg Eugene, Schleifer Karl-Henz et Stackebrandt Erko., (2006).** The Prokaryotes, 3^{ème} edition, Volume 2, A Handbook

Référence bibliographique

- on the Biology of Bacteria : Archea. Bacteria :Firmicutes, Actinomycetes, *edition Springer*, USA.
29. **Emami S, Shafiee A, Foroumadi A., (2005).** Quinolones: recent structural and clinical developments. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research* 3: 123-136.
 30. **Emerson Rudi de Lima Procópioa, Reis Ingrid da Silvaa, Kassawara Mayra Martinsa, LúcioJoão de Azevedoa&MagaliJanete de Araújo., (2012),** Antibiotics produced by *Streptomyces*, *Braz J Infect Dis* 16(5), P 466–471
 31. **Figarella .J, Leyral.G et Terret .M., (2007).** Microbiologie générale et appliquée DELGRAVE EDITION. France. Pp 102,104, 106, 107,108
 32. **Gaudy C, Buxeraud J., (2005).** Antibiotiques : pharmacologie et thérapeutique. Elsevier Masson.ISBN- 2842996372.
 33. **Geraldine M., Schofield M. et Schaal K.P., (1981).** A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbiol.* 127: 237-259.
 34. **Gessard, C., (1984).** Classics in infectious diseases. On the blue and green coloration that appears on bandages. *Rev. Infect Dis.* 6 Suppl 3: 775-776.
 35. **Ginolhac, A., (2006).** Metagenomique et bioinformatique : Etude des polyktides synthèses bacteriennes. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard-Lyon I.pp146.
 36. **Gottlieb, D., (1973).** General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F.A. Skinner. Academic Press, London, New York.
 37. **Grigorova, R., Norris, J.R., (1990).** Techniques in microbial ecology. *Methods in Microbiology*, Vol. 22. Academic Press, London, pp. 627.
 38. **Guiraud J.P., (1998).** Techniques d'analyse microbiologique, dans : Microbiologie alimentaire. *Dunod Paris*: 171-334.
 39. **Hogan, D. and Kolter, L., (2003).** Why are bacteria referactory to antimicrobials? *Current Opinion in Microbiology.* 472-477.
 40. **Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T., (1994).** *Bergey's manual of determinative bacteriology*, 9th edition, Williams and Wilkins, Baltimore.
 41. **Isabelle Harvey., Mai., (1999).**Médecine Expérimentale. Sélection de tests discriminants pour l'identification rapide des actinomycètes thermophiles impliqués dans l'alvéolite allergique extrinsèque, Mémoire, université laval canada, p 112

Référence bibliographique

42. **Ishizawa S.; Araragi M., (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107
43. **Kalakoutsii L. V.; Agre N. S., (1976).** Comparative aspects of development and differentiation in actinomycetes. *Bacteriol. Rev.* 40 (2), 469–524.
44. **Kämpfer Peter (2006),** The Family Streptomycetaceae, Part I: Taxonomy, *Prokaryotes 3:* P 538–604.
45. **Kim B., Al-Tai A. M., Kim S. B., Somasundaram P., Michael Goodfellow M., (2000).** *Streptomyces thermocoprophilus* sp. nov., a cellulase-free endoxyylanaseproducing streptomycete. *Int. J. Sys. Ev. Microbiol.*, (50): 505-509.
46. **King DE, Malone R, Lilley SH., (2000).** New classification and update on the quinolone antibiotics. *American family physician.* 61 (9): 2741–8.
47. **Kitouni Mahmoud., (2007),** Isolement de Bactéries Actinomycétales productrices d'Antibiotiques à Partir d'Ecosystèmes Extrêmes. Identification Moléculaires des Souches Actives et Caractérisation des Substances Elaborées, thèse Doctorat, Université de Mentouri, Constantine, Algérie : P 1-176.
48. **Kutzner, H.J., (1981).** The family *Streptomycetaceae*. In the prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows A., and Schegel H. (eds). *Berlin: Springer-Verlag KG,pp.*
49. **Larpent J.P., Sanglier J.J., (1989).** Bbiotechnologie des antibiotiques. Masson Paris Milan Barcelone Mexico.p .1 :21 :104 :106
50. **Larpent, J. P. (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Lavoisier.France.
51. **Laurent. F., (2009) .**Principales β -lactamines : Pénicillines G, A, M, inhibiteurs de β - lactamases, Uréidopénicillines, Carboxypénicillines C1G, C2G, C3G, Monobactames Carbapénèmes. Groupement Hospitalier Nord Lyon. Pp 8.
52. **Lechevalier A.H., 1981-**Introduction to the order Actinomycetales, (volume 2). Springer-Verlag Edition Berlin: 1915-1922
53. **Locci R., (1989).** Streptomycetes and related genera. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie. Eds: S.T.Williams, M.E. Sharpe et J.G. Holt.. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. 4, 2451-2508
54. **M. Saravana, K. Panduranga Rao, and Pectin., (2010):** gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: influence of anionic

Référence bibliographique

- polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules, carbohydrate Polymers, 80, 808-816.
55. **Madigan M. T., Martinko J.M. & Parker J., (1997)**, Biology of microorganisms. Printice, Hall International Inc, New York: P 146-147.
 56. **Madigan M.T, Martinko J.M, Stahl D, Clark D.P., (2012)**. brock biology of microorganisms. 13th Edition Hardcover..ISBN-13: 978-0-321-64963-8.
 57. **Madigan.M et Martinko. J., (2007)**. Biologie de Micro-organismes. Université Carbondale de l'Illinois du sud .11e édition. P 702, 705, 711,860, 862.
 58. **Manteca Angel & Sanchez Jesus., (2009)**, Streptomyces Development in Colonies and Soils, *Applied and Environmental Microbiology*, Vol 75, N° 9: P 2920–2924.
 59. **Marchal, N., Bourdon, J. L., (1991)**. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs –Paris. 509p.
 60. **McKinney R. E., (2004)**. Environmental Pollution Control Microbiology. CRC Press : New York. Pp: 448.
 61. **Messaoudi O., (2012)**. Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Bechar).
 62. **Messaoudi O., Bendahou M., Benamar I., 15 juin (2016)**. Les zones extrêmes algériennes comme sources de nouveaux antibiotiques, Edition universitaires européennes, p79
 63. **Mouton.Y, Bingen.E, Deboxker.Y et Dubreuil.L., (2000)**. Antiviraux Anti-infectieux. Éditions John Libbey Eurotext. Paris.P116.
 64. **Nikaido, H., (2003)**. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 67(4) 593-656.
 65. **Nitsh B and Kutzner HJ., (1969)**. Production of Pectinase by *Aspergillus niger* Cultured in Solid State Media. International Journal of Biosciences (IJB), ISSN: 2220-6655 (Print), Vol. 1, No. 1. pp: 33-42.
 66. **Nonomura H., 1969**. Key for classification and identification of 458 species of the Streptomyces included in ISP. J. Frement. Technol., 52(2): 78-92.
 67. **Noura El-Ahmady El-Naggar., A. A. Sherief and Sarah Shawky Hamza., 9 December (2011)**.*Streptomyces aegyptia* NEAE 102, a novel cellulolytic streptomycete isolated from soil in Egypt African Journal of Microbiology Research Vol. 5(29), pp. 5308-5315

Référence bibliographique

68. **Oskay M., Tamer A.U., Azeri C., (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology*, 3 (9), 441 – 446.
69. **Othniel Hermes., (2011).** Résistance (Biologie). Biologie, Résistance aux antibiotiques, Antiviral, Infection nosocomiale, Epidémiologie, Eco-épidémiologie. P 12, 14, 41, 42, 43.
70. **Prescott L. M.; Harley J. P.; Klein D. A., (1995).** Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles: P 806, 807 ,813, 819, 805–825.
71. **Prescott L.M, Harley J.P, Klein D.A., (2003).** Microbiologie. De Boeck Edition (Berlin), 2ème édition. ISBN-10: 2804142566. pp 539.
72. **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., (2007).** Microbiologie. De boeck : bruxelles. 2eme edition pp: 1088.
73. **Prescott, L., Harley, J.P., Klein D.A., (2010).** Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. Pp 506–517.
74. **Puyt, J. D. And Fauble, V., (2002)** . Médicaments anti-infectieux en médecine vétérinaire: bases de l'antibiothérapie, *Pfizer santé animale*, Pp 201.
75. **Rangaswami G.; Bagyaraj D. J.; Bagyaraj D. G., (2004).** Agricultural Microbiology. PHI: New Delhi. Pp: 440.
76. **Raval (2012).** Biotransformation of a single amino acid L-tyrosine into bioactive molecular L-DOPA. *Int JSci*;2:2250-3153
77. **Roy S, Das I, Munjal M, Karthinkl, Kumar G, Kumar S, and Rao RVB ., (2014).** Isolation and characterization of tyrosinase produced by marine anterobactéria and its application in the removal of phenol from aqueous environment. *Front. Biol.*9(4): 306-316.
78. **Saffroy Sophie., (2006),** Etude du Métabolisme Carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*, Thèse Doctorat, Institut Polytechnique de Lorraine, France, P 6-14.
79. **Salomon C. E.; Magarvey N. A.; Sherman D. H., (2004).** Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an ever brighter future for marine natural product drug discovery. *National Production Rep.*, (21):105-121.
80. **Sanglier J.J., Wellington E.M.H., Kamoun A., Kelly C., Mercer D.K., Prinzi S., Trigo C., (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol.* 144,661-663.
81. **Saravana kumara N, Dhivyab D, Vijayakumar B (2011).** A focus on quinolones and its medical importance. *Intl J Novel Tr Pharm Sci.* Vol 1. N°1.

Référence bibliographique

82. Scherr Nicole & Nguyen Liem., (2009), Mycobacterium versus Streptomyces—we are different, we are the same, *Current Opinion in Microbiology* 12: P 699–707.
83. Shirling E. B & Gottlieb D., (1966), Methods for Characterization of Streptomyces Species, *International Journal of Systematic Bacteriology*, Vol. 16, No. 3 : P 313-340.
84. Sibanda. T, Leonard. V. Mabinya. L. V, Mazomba. N, Akinpelu. D. A, Bernard. K, Olaniran. A. O, and Okoh. A. I., (2010). Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Mol Sci*. Vol : 11. N° 7. Pp: 2612–2623.
85. Smaoui Slim., (2010), Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés, thèse de doctorat, Université de Toulouse : 1-187, France.
86. Solanki, R., Khanna, M., et Lal, R., (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Ind. J. Microbiol.*; 48, 410-431.
87. Sonenshein, (2001), Tufts Univ Boston MA:ASM, *Bacillus subtilis* and its closest relatives.
88. Sudha, S.K.S. and Hemalatha, R., (2015). Isolation and Screening of Antibiotic Producing Actinomycetes from Garden Soil of Sathyabama University, Chennai. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 8, 110-114
89. Talbert.M, Willoquet.G et Gervais. R., (2009) *Pharmaco clinique*, Wolters Kluwer France. Pp 641, 648,655
90. Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K., Bora T.S., (2007). Isolation and screening *Streptomyces* in soil from areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Microbiol. Médi.*, 17 : 242-249.
91. Theilleux J., (1993). - les actinomycètes in *Microbiologie industrielle : Les microorganismes d'intérêt industriel*, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria, V 612p, pp 425.
92. Tillostn G S., (1996). Quinolones: structure-activity relationships and future predictions. *J. Med. Microbiol.* Vol. 44 320-324.
93. Vasil, M. L., (1986). *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. *J.Pediatr* 108, 800-805.
94. Verma V. C.; Gond S. K.; Kumar A.; Mishra A.; Kharwar R. N.; Gange A. C., 2009. Endophylitic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-Microbiol activity. *Microbiol Ecology.*, (57): 749-756.

Référence bibliographique

95. **Waksman, S.A., Henrici, A.T., (1943).** The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol*, 46(4): 337–341
96. **Willey J.M, Sherwood L, Woolverton C.J., (2008).** Prescott's Principles of Microbiology. McGraw-Hill Higher Education. ISBN-9780073375236.
97. **Xiaohui L., Xuezhi D., Liqiu X., Yunjun S., Can Y., and Jia Y., (2012).** Proteomic Analysis of *Bacillus thuringiensis* Strain 4.0718 at Different Growth Phases. The Jean-Christophe AUGUSTIN. Scientific World Journal. Article ID 798739:p10.
98. **Zermane F., (2007).** Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse.p33-38.
99. **Zhi X.Y., Li W.J. et 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 highertaxa. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 59, 589–608.
100. **Zvyagintsev D. G.; Zenova G. M.; Sudnizin I. I.; Doroshenko E. A., (2005).** The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. Vol : 405. Pp 461-463.
101. **Okami, Y., Hotta, K., (1988).**Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, editors. Actinomycetes in biotechnology. New York: *Academic Press, Inc*; p.33-67.

Resources Internet

- 1- <http://dx.doi.org/10.5772/61461>
- 2- <http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.79890>
- 3- www.science-et-vie.net
- 4- http://bioutils.unige.ch/experiences/images_exp_gram/BS.jpg.
- 5- www.gettyimage.com.

Annexes

Annexe I : Composition des milieux de cultures et des solutions

1. les milieux de culture :

Caséine amidon agar

- Amidon.....10g
- Caséine.....0,03g
- KNO₃.....2g
- K₂HPO₄.....0,02g
- NaCl.....2g
- MgSO₄ .7H₂O.....2g
- CaCO₃.....0,05g
- FeSO₄.7H₂.....0.01g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH= 7.3

Gélose nutritive

- Amidon.....10g
- Peptone.....5g
- Extrait de viande.....1g
- Extrait de levure.....2g
- NaCl.....5g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7.5

Citrate de Simmons

- Citrate de sodium..... 1g
- Bleu de bromothymol.....0,08g
- Chlorure de sodium.....5g
- Sulfate de magnésium.....0,2
- Hydrogénophosphate de potassium.....1g
- Dihydrogénophosphate d'ammonium.....1g
- Agar.....15g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,1

Gélose TSI

- Peptone.....15g
- Extrait de viande.....3g
- Extrait de levure.....3g
- Peptone pepsique de viande.....5g
- Glucose.....1g
- Lactose.....10g
- Saccharose.....10g
- Rouge de phénol.....0,05g
- Chlorure de sodium.....5g
- Thiosulfate de sodium.....0,3g
- Agar.....18g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Urée indole

- Urée.....2g
- L-tryptophane.....0.3g
- Ethanol à 0,95.....1cm³
- Rouge de phénol.....2,5mg
- Chlorure de sodium.....0,5g
- Dihydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Hydrogénophosphate de potassium.....0,1g
- Eau distillée.....1L
- PH=7

Bouillon Clark et Lubs

- Peptone.....5g
- Glucose.....5g
- Hydrogénophosphate de potassium.....5g
- Eau distillée.....1L
- PH=7,5

Milieu d'extraction**Milieu Bennett**

- Extrait de levure2g/l
- Extrait de viande.....1g/l
- Peptone2g/l
- Glucose.....10g/l
- Eau distillée1L
- PH = 7,3

2. Les solutions

2.1. Tampon acétate de Sodium à 0,05M

- 4,1 g d'acétate de Na.
- 100 ml d'eau distillé.
- Ajuster le pH à 4,7 ou 4,6 avec l'acide acétique dilué.

2.2. Préparation de la liqueur de Fehling

- **Solution cuprique A** : Sulfate de cuivre pur : 40 g ; Acide sulfurique : 2 ml ;
Eau : 1L
- **Solution Tartarat-Alcaline B** : Tartrate double de sodium et de potassium : 200 ;
Soude : 150 g ; Eau : 1L

2.3. Préparation de biuret

- Sulfate de cuivre $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1,5g
- Tartaratedoule de potassium et de sodium 6g
- NaOH 30g
- Iode de potassium 1g
- H_2O : 1L

Annexe II : Les rendements des deux extraits des isolats de *Streptomyces sp.*

Tableau : Les rendements moyens en poids des ATB et des huiles des isolats de *Streptomyces sp.*

Souche	Rendements des ATB (g)	Rendements des Huiles (g)
A3	0,26	18,18
A10	0,07	12,35
A11	0,08	2,64
A12	0,06	4,55

Résumé

Quatre souches d'actinomycètes ont été isolées à partir de différents échantillons du sol de la zone d'Ouillis (Mostaganem).

Après la purification des souches d'actinomycète, une série de tests biochimiques et physiologiques ont été réalisés. Des inoculums des différents isolats ont été utilisés dans la production de deux métabolites (antibiotique, huile). Suivie d'une évaluation de l'activité antibactérienne des extraits (ATB, huiles) vis-à-vis eux souches pathogènes *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 et *Bacillus subtilis* ATCC6633 par la méthode de disque.

Les observations macroscopiques et microscopiques confirment que les quatre isolats présentent les caractéristiques des *Streptomyces sp*, colonies des diamètres différents de 2 à 5 mm. Les bactéries sont à Gram positif, leurs mycéliums diffusent de différentes pigmentations. Les tests physiologiques (amidon, caséine...etc.) et biochimiques (citrate, lécithine...etc.) sont positifs à l'exception de quelques-uns qui sont négative. Les tests montrent que les quatre souches sont productrices des substances bioactives. Les rendements des antibiotiques et des huiles sont respectivement (0,26 ; 0,08 ; 0,07 et 0,06 g) et de (18,18 ; 12,35 ; 4,55 et 2,64g). Les résultats de l'antibiogramme confirment une activité antibactérienne contre les deux germes pathogènes, les zones d'inhibitions sont variables pour les deux extrait 0,65± 0,05 à 1,65 ± 0,15 cm et par fois plus. Les CMI des deux extraits obtenus respectivement correspondent aux concentrations aux volumes (0,0012 g/l ; 0,0005 g/l) et (20 µl à 40 µl ; 10 µl à 20 µl). Il est préférable d'approfondir cette étude par d'autres méthodes d'extraits et de purifications pour une meilleure exploitation des souches.

Mots clé : actinomycète, *Streptomyces sp*, substances bioactives, antibiotique, activité antibactérienne

Summary

Four actinomycetes strains were isolated from different soil samples , which are located in Ouillis area (Mostaganem) .After purification of actinomycete strains, a series of biochemical and physiological tests performed .Inoculums of the different isolates, were used in the production of two metabolites (Antibiotics, oil).

An evaluation of the antibacterial activity of extracts (ATB, oils) against two pathogenic strain *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 and *Bacillus subtilis* ATCC6633 is followed by the disk method. Macroscopic and microscopic observations confirm that the four isolates exhibit the characteristics of *Streptomyces sp*, colonies of different diameters of 2 to 5 mm. Bacteria are at Gram positive; their mycelium diffuse different pigmentations. Physiological tests (starch, casein, etc.) and biochemical tests (citrate, lecithin...) are positive except for a few which are negative. The tests show that the four strains are bioactive. The yields of antibiotics and oils are respectively (0.26; 0.08; 0.07 and 0.06 g) and (18.18; 12.35; 4.55 and 2.64g). Antibacterial activity against two pathogenic germs is confirmed by antibiotic results, with inhibition zones varying for two extract [(0.70 ± 0,20 to 1.60 cm) and (0.15 ± 1.65 ± 0.15 cm)] et [(0.65 ± 0.05 to 1.30 cm) and (0.70 to 1.60 ± 0.10 cm)] and more. The CMI of the two extracts obtained respectively correspond to concentrations (0.0012 g/l to 0.0005 g/l) and volumes (20 µl to 40 µl and 10 µl to 20 µl). It is preferable to deepen this study by other methods of extracts and purifications for a better exploitation of the strains.

Keywords: actinomycete, *Streptomyces sp*, bioactive substances, antibiotic, antibacterial activity

ملخص

تم عزل أربع سلالات من البكتيريا الشعاعية من عينات التربة المختلفة من منطقة عبد المالك رمضان المسماة ويليس (ولاية مستغانم). بعد تنقية سلالات الأكتينومييسيت، أجريت سلسلة من الاختبارات الكيميائية والفيزيولوجية. تم استخدام مختلف العازلات في إنتاج اثنين من الأيض الحيوية النشطة (المضادات الحيوية، الزيوت). تليها تقييم للنشاط المضاد البكتيري من مقتطفات وجهها لوجه لسلالات ممرضة *Pseudomonas aeruginosa* ATCC27853 و *Bacillus subtilis* ATCC6633 بواسطة تقنية القرص.

تؤكد الملاحظات بالعين المجردة والمجهريّة أن العزلات الأربعة لها خصائص *Streptomyces sp*، المستعمرات بأقطار مختلفة من 2 إلى 5 ملم. البكتيريا إيجابية الجرام، تنشر الصبغات المختلفة. الاختبارات الفسيولوجية (النشا، الكازين، إلخ) والاختبارات البيو كيميائية (السترات، الليسيثين مادة دهنية، وما إلى ذلك) إيجابية، باستثناء عدد قليل منها سلبي.

غلات المضادات الحيوية والزيوت على التوالي (0.26، 0.08، 0.07 و 0.06 غرام) و (18.18، 12.35، 4.55 و 2.64 غرام). تؤكد نتائج المضاد الحيوي على نشاط مضاد للجراثيم ضد كل من مسببات الأمراض، ومناطق تثبيط متغيرة لكلا المستخلصين 0.05 ± 0.65 إلى 1.65 ± 0.15 سم ومرات أكثر. مناطق التثبيط للمستخلصين اللذين تم الحصول عليهما على التوالي مع تركيزات الحجم (0.0012 غ / لتر، 0.0005 غ / لتر) و (20 ميكرو لتر إلى 40 ميكرو لتر، 10 ميكرو لتر إلى 20 ميكرو لتر). يفضل تعميق هذه الدراسة بطرق أخرى من المستخلصات والتنقية من أجل استغلال أفضل للسلالات.

الكلمات الدالة: اكتينومييسيت، ستربتومييسيس س، مواد نشطة بيولوجيا، مضاد حيوي، نشاط مضاد للجراثيم.