

Université Abdelhamid Ibn
Badis-Mostaganem
Faculté des Sciences de la
Nature et de la Vie



جامعة عبد الحميد بن باديس
مستغانم
كلية علوم الطبيعة و الحياة

DEPARTEMENT DE BIOLOGIE

N°...../SNV/2017

MÉMOIRE DE FIN D'ÉTUDES

Présenté par

Mlle Bessaâd Noura

Mlle Sadaoui Kelthoum

Pour l'obtention du diplôme de

MASTER EN (EX. BIOLOGIE)

Spécialité: BIOTECHNOLOGIE DES MICRO-ORGANISMES

THÈME

**Contribution à l'étude comparative des activités antibactériennes
de deux extraits bruts d'antibiotique et de l'huile synthétisés par
des *Streptomyces sp* isolés des sols de la zone Abd-El-Malek
Ramadan (Mostaganem)**

Soutenue publiquement le 04/ Juillet/ 2017

DEVANT LE JURY

Président	Mr R. Djibaoui.	Professeur à l'Université de Mostaganem
Encadreur	Mlle F. Tissouras	Maître de Conférences Université de Mostaganem
Examinatrice	Mlle R. Bennama	Maître de Conférences Mostaganem

2016-2017

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 Melle **F. Tissouras** Enseignante et Maître de conférences à la faculté SNV université de Mostaganem. Nous tenons à exprimé nos très sincèrement 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 gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines.*

*Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur **R. Djíbaoui** chef du parcours de la Biotechnologie des Micro-organisme d'avoir accepter de présider le jury.*

*Je tiens également à témoigner ma gratitude Mme **R. Bennaâma** Maître de conférence la faculté SNV université de Mostaganem d'avoir acceptée d'examiné le travail malgré ses multiples tâches.*

*Un grand merci à tous les ingénieurs des laboratoires de Microbiologie et de Biochimie Mme **F. Amír**, Mme **F.atíma**, Mme **Mokhtaría**, Mme **Saadía**, Mr **D. Bouziane** et Mr **M. Souan**.*

DEDICACES

*Je remercie ALLAH le Généreux pour m'avoir guidé vers la
Lumière de la recherche du savoir et de la science*

Je dédie ce modeste travail à:

*Les deux personnes, les plus chers au monde que
je ne remercierais jamais assez : leur aides, l'encouragement,
Soutiens, sacrifices et leur patience pendant toute ma vie :*

Mes chers parents

Ma chère sœur : Samia

Mes chers frères : Mohammed, Mourad, Walid

Mes chères amies : Kelthoum, Fatima, Houda, Ahlem, Nacera, Houria

*Mes chères amis de la promotion de master de parcours
biotechnologies des micro-organismes en témoignage de l'amitié qui
nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés
ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de
santé et de bonheur.*

A

*Touts les étudiants, enseignants et personnels du
Département des Sciences Biologique.*

DEDICACES

Je dédie ce modeste travail à:

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

Mes chères sœurs : Yamina, Nacera, hasna, Houaria et Fouzia

Mes chères frères : Sliman , Ibrahim et Lakhder

Les femmes frères : Fatima, zahia, et malika

mon fiancé : louafi hadj

Tous mes chères amis : Noura , Houda , Ahlem

*Mes chères amis de la promotion de master de parcours
biotechnologies des micro-organismes 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.

Liste des abréviations

AIA	:	Acide Indole Acétone
ATB	:	Antibiotique
CG	:	Chromatographie en phase Gazeuse
HPLC	:	Chromatographie Liquide Haut performance
IR	:	Infra rouge
MOS	:	Matière Organique du Sol
MP	:	Mycélium Primaire
MS	:	Mycélium Secondaire
RMN	:	Résonance Magnétique Nucléaire
SM	:	Spectrophotométrie de Masse

LISTE DES FIGURES

Figure 01	Formation du sol.....	2
Figure 02	Proportion des principaux composants du sol en volume.....	3
Figure 03	La texture du sol.....	6
Figure 04	Diagramme triangulaire des classes texturales de sol d'après les dimensions des particules.....	6
Figure 05	Les propriétés physico-chimiques du sol.....	7
Figure 06	Composition des MO et turn over.....	8
Figure 07	Rôles et fonctions des MO du sol.....	10
Figure 08	Type de formation des spores exogènes des actinomycètes.....	11
Figure 09	Type des sporanges chez quelques genres d'actinomycètes.....	13
Figure 10	les horizons d'un profil du sol.....	16
Figure 11	Le schéma représente cycle de vie de sporulation des actinomycètes sur milieu solide.....	17
Figure 12	Morphologie rencontrées aux cours de culture liquide de streptomycète.....	18
Figure 13	Les structures chimiques des cinq grandes familles des antibiotiques.....	21
Figure 14	Mode d'action des antibiotiques.....	22
Figure 15	Les actions des ATB sur la synthèse des protéines négative.....	23
Figure 16	Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram.....	24
Figure 17	Protocole expérimental général.....	26
Figure 18	Site des prélèvements des échantillons région d'Ouillis (Mostaganem).....	27
Figure 19	Les points des prélèvements des échantillons.....	27
Figure 20	Préparation des dilutions de sol.....	28
Figure 21	Protocole d'extraction des antibiotiques.....	33
Figure 22	Technique du test antibiogramme des extraits ATB et l'huile des isolats d'actinomycète (diffusion de disque).....	34
Figure 23	Observations macroscopiques des colonies des streptomycètes sp à l'aide d'une loupe binoculaire 4x10.....	36
Figure 24	purification des isolats d'actinomycètes sur gélose nutritif.....	37
Figure 26	Résultats du test d'antagonisme par deux méthodes.....	39

Figure 27	Hydrolyse de la caséine.....	41
Figure 28	Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des six isolats des <i>Streptomyces</i> <i>sp</i>	42
Figure 29	Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des <i>Streptomyces sp</i>	43
Figure 30	Tests réduction des nitrites positif en présence S4 et négatif avec les autres souches.....	43
Figure 31	Test positif de production d'H ₂ S avec les six souches <i>Stréptomyces sp</i>	44
Figure 32	Test négatif avec S5 et S6 de la catalase et positif avec les autres isolats.....	45
Figure 33	Test négatif de dégradation de l'urée en présence des six isolats de <i>Stréptomyces</i> <i>sp</i>	45
Figure 34	Test négatif d'utilisation de citrate en présence des six isolats de <i>Stréptomyces</i> <i>sp</i>	46
Figure 35	Tests des fermentations intermédiaires positifs avec les souches d'actinomycètes	46
Figure 36	L'évolution des poids pondéraux de la masse microbienne des isolats# d'actinomycètes.....	

List des tableaux

Tableau01 :	Distribution des microorganismes en fonction du sol.....	4
Tableau02 :	Liste de certains antibiotiques produits par <i>Streptomyces sp.</i>	14
Tableau03 :	Quelques exemples d'ATB à activités multiples.....	19
Tableau04 :	Caractérisations macroscopiques et microscopiques des isolats des <i>Streptomyces sp.</i>	35
Tableau05 :	Les Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes.....	40

TABLE DES MATIÈRES

Remerciements	
Dédicace	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux.....	
Résumé.....	
Introduction.....	1

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Chapitre I : L'activité du Sol	
1. Définition du sol.....	2
2. Caractéristiques générales des phases du sol	2
2.1. La phase solide.....	3
2.1.1. La fraction minérale.....	3
2.1.2. La Fraction organique.....	3
2.2. Phase liquide.....	4
2.3. La phase gazeuse.....	4
3. Les propriétés physicochimiques du sol.....	5
3.1. Les propriétés physiques du sol.....	5
3.1.1. Structure du sol.....	5
3.1.2 La Texture.....	5
3.2. Les propriétés chimiques des sols.....	7
3.2.1. La couleur du sol	7
3.2.2. Matière organique du sol.....	8
4. La microflore du sol.....	8
4.1. Les bactéries.....	8
4.2. Les actinobactéries.....	9
4.3. Les champignons.....	9
5. Les fonctions multiples du sol.....	10
Chapitre II: Les actinomycètes et les streptomycètes	
1. Caractéristiques principales des actinomycètes.....	11
2. La morphologie.....	11
2.1. Mycélium primaire.....	11
2.2. Mycélium secondaire.....	11
2.3. Sporulation d'actinomycètes.....	12
3. Importance des actinomycètes.....	13
3.1. Production d'enzymes.....	13
3.2. Production d'antibiotique.....	14
4. Caractéristiques principales de genre <i>Streptomyces</i>	14
5. Classification de <i>streptomycète</i>	15
6. L'habitat de <i>Streptomyces</i>	15
7. Cycle de vie de <i>Streptomycètes</i>	16

7.1. Dans un milieu solide.....	16
7.2. Dans un milieu liquide.....	17
Chapitre III : l'activité de l'antibiotique	
1. Définition.....	19
2. La nature chimique des ATB.....	19
3. Classification des ATB (les familles).....	20
3.1 Les β - lactamines.....	20
3.2. Les glycopeptides.....	20
3.3. Les aminosides.....	20
3.4. Les macrolides.....	21
3.5. Les quinolones.....	21
4. Mode d'action.....	21
4.1. Action sur la paroi.....	22
4.2. Action sur la membrane cytoplasmique.....	22
4.3. Action sur des acides nucléiques.....	22
4.4. Action sur la synthèse protéique.....	23
5. Résistance des bactéries à l'ATB.....	23
5.1. La résistance naturelle.....	24
5.2. Résistances acquises.....	24
5.3. Résistance croisée.....	25
6. Les effets chimio-thérapeutiques et vétérinaires des antibiotiques.....	25
Chapitre V : Matériel et méthodes	
1. L'objectif global.....	26
2. Protocole expérimental général.....	26
3. Sites de prélèvement de l'échantillon.....	27
4. Isolement des actinomycètes (<i>Streptomyces</i>).....	28
4.1. Prétraitement des échantillons.....	28
4.2. Les Milieux de culture.....	28
4.3 Préparation de la suspension de dilution et ensemencements.....	28
5. Purification et conservation des isolats.....	29
6. Caractérisation et identification des Actinomycètes.....	29
6.1. Caractérisation macroscopique.....	29
6.2. Caractérisation microscopique.....	29
6.3. Caractérisation physiologique.....	29
6.3.1. L'hydrolyse de l'amidon.....	30
6.3.2. L'hydrolyse de la caséine.....	30
6.3.3. La dégradation de l'urée.....	30
6.4. Caractérisation biochimique.....	30
6.4.1. L'utilisation de citrate.....	30
6.4.2. Les fermentations intermédiaires.....	30
6.4.3. La réduction de nitrate réductase.....	30
6.4.4. La production d'H ₂ S.....	31
6.4.5. La catalase.....	31
6.4.6. Hydrolyse de la gélatine.....	31
7. Test antimicrobien de la souche d'actinomycète.....	31
7.1. Criblages primaire.....	31
8. La fermentation submergée.....	32
8.1. Préparation d'inoculum et fermentation.....	32

8.2. Extraction des ATB.....	32
8. Extraction des huiles brutes.....	34
10. Tests de diffusion en milieu solide de l'antibiotique.....	34
Chapitre IV : Résultats et Discussion	
1. Étude morphologique des actinomycètes.....	35
1.1. Aspects macroscopiques.....	35
1.2. Aspects microscopiques.....	38
2. Test antagonisme des souches <i>Streptomyces</i> sp.....	39
3. Tests physiologiques et biochimiques.....	40
➤ Hydrolyse de la caséine	41
➤ Hydrolyse de l'amidon	42
➤ Hydrolyse de la gélatine.....	42
➤ Réduction des nitrates	43
➤ Production d'H ₂ S	44
➤ Recherche de Catalase	44
➤ Dégradation de l'urée	45
➤ L'utilisation de citrate	46
➤ Les fermentations intermédiaires	46
4. Fermentation submergée.....	47
5. Les rendements des extractions d'ATB et de l'huile.....	48
➤ Les rendements des extractions d'ATB.....	48
➤ Les rendements de l'huile :.....	49
6. Test antibiogramme des deux extraits (ATB et l'huile).....	51
Conclusion	55
Références Bibliographiques.....	56
Annexes.....	64

INTRODUCTION

Introduction

Un antibiotique est une substance chimique naturelle ou synthétique produite par les micro-organismes qui ont le pouvoir d'inhiber la croissance ou détruire les bactéries et d'autres micro-organismes (**Larpent et Sanglier, 1989**). En 1928, la pénicilline est le premier antibiotique ayant la capacité de tuer les bactéries Gram+ a été découverte par le père des biologistes Alexandre Fleming. Malgré l'efficacité de cette molécule de nombreuses bactéries ont développé des résistances contres l'excès d'utilisation des antibiotiques et plus particulièrement la pénicilline. Plusieurs chercheurs ont publiés leurs travaux sur les bactéries résistantes à ces antibiotiques et d'autres cherchant toujours à trouver des alternatives comme les huiles essentielles (**Tortora et al., 2003**). De plus, il existe des antibiotiques semi-synthétiques, qui sont en fait des antibiotiques naturels modifiés par l'addition de groupements chimiques dans le but de les rendent moins sensibles à l'inactivation par les micro-organismes (**Prescott et al., 2010**). La majorité des substances antibiotiques sont synthétisées à partir des microorganismes. De nombreux antibiotiques ont été isolés d'une grande variété des actinobactéries et ils ont été employés dans beaucoup de domaines : industriel, agriculture, vétérinaire, thérapeutique et pharmaceutique (**Oskay et al., 2004**). Dans ce contexte le travail est mené, le choix a porté sur les actinobactéries et plus particulièrement les *Streptomyces*. Ces bactéries sont en général filamenteuses, à Gram positive, elles possèdent des mycéliums végétatifs et aériens ramifiés. Elles jouent un rôle essentiel dans la production des métabolites biactifs. Les actinomycètes représentent une source biologique importante à effet bactéricides.

La présente étude consiste à isoler les actinobactéries du sol de zones Abd-El-Malek Ramdan qui est située dans le périphérique de la ville de Mostaganem. Après la purification des isolats, les souches vont faire l'objet d'un criblage par un test d'antagonisme vis-à-vis deux souches pathogènes *S. aureus* et *E. coli* pour la sélection des isolats producteurs des substances bioactives. Ces isolats vont être utilisés dans la production de deux métabolites secondaires (l'antibiotique) et primaire (l'huile). Les activités antibactériennes des deux extraits bruts (antibiotique et de l'huile) sont testées contre les mêmes souches pathogènes pour la détermination des CMI et CMB.

Enfin, le dernier chapitre de la partie expérimentale rassemble la présentation des résultats et leurs discussions, suivies d'une conclusion générale et des perspectives.

Partie
Bibliographiques

Chapitre I

1. Définition du sol

Les sols constituent l'élément essentiel des biotopes. C'est l'altération des roches mères, due à des forces chimiques et biologiques, qui donne naissance au régolite. Ils sont aussi dénommé pédosphère qui résulte de l'interaction de deux compartiments biosphériques (l'atmosphère et les deux couches superficielles de la lithosphère) (fig. 1). Les cinq principaux facteurs impliqués dans la formation du sol sont la roche mère, le climat, la topographie, l'activité biologique et le temps (Atlas et Bartha *in* Noumeur, 2008).

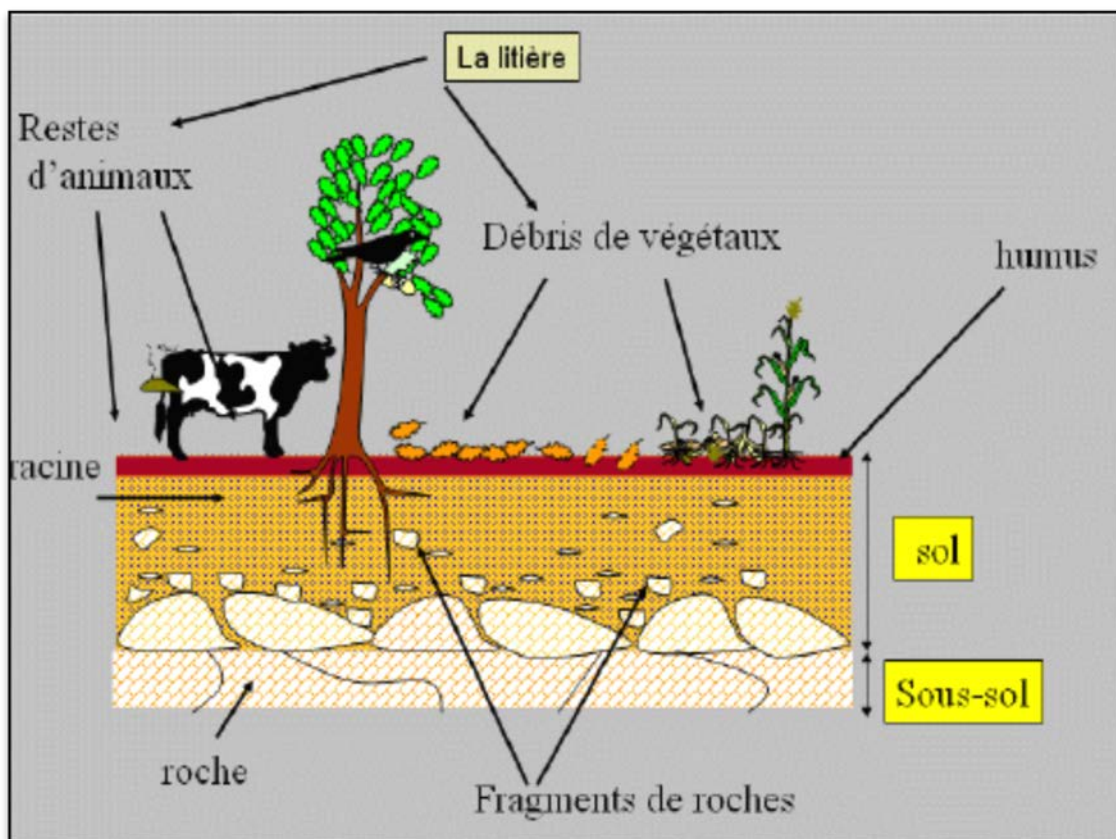


Figure 1 : Formation du sol (Antoni, 2012).

2. Caractéristiques générales des phases du sol

Le sol est constitué de trois phases : solide, liquide et gazeuse. Leurs proportions sont variables en fonction de leur état hydrique, propriétés physicochimiques, activité biologique et les contraintes mécaniques qu'ils subissent (fig. 2).

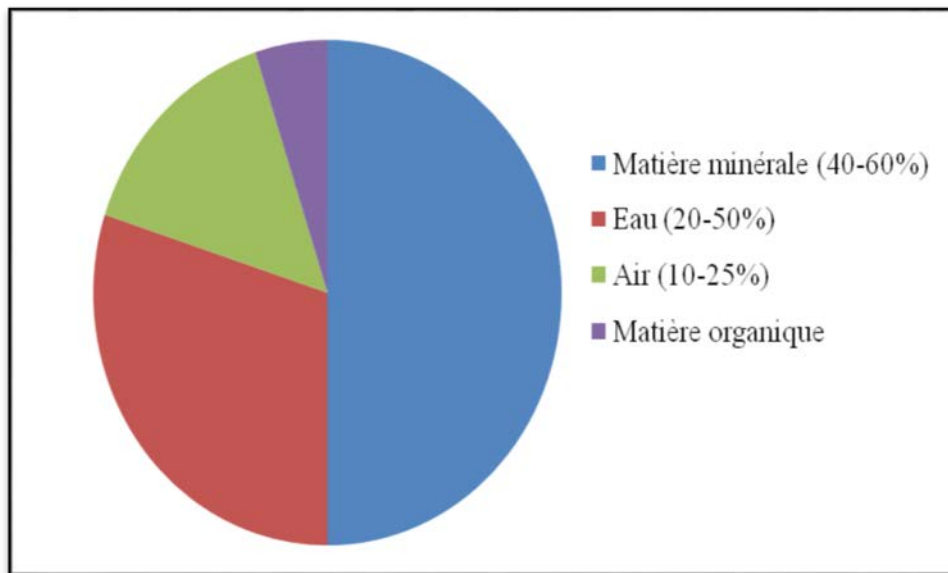


Figure 2 : Proportion des principaux composants du sol en volume (White, 2006).

2.1. La phase solide : Elle est constituée par des minéraux et des matières organiques en proportions variables. On peut même considérer les organismes vivants du sol comme une partie de la phase solide (Calvet, 2000). On distingue deux fractions dans la phase solide :

2.1.1. La fraction minérale : Les minéraux du sol varient en général de 95 à 99%. La composition minérale est extrêmement diverse et elle dépend de la nature de la roche-mère. Ces éléments minéraux peuvent avoir différentes tailles granulométriques (fig. 3 et 4) (Quénéa, 2004).

Mirsal (2004) rapporte que la fraction minérale n'intervient pas ou peu dans la sorption des polluants par les organismes, à l'exception lorsque la teneur en carbone organique du sol est faible.

2.1.2. Fraction organique

La fraction organique d'un sol est constituée à plus de 80% de matière organique morte (résidus de plantes et d'animaux en état de décomposition naturelle) (Paul et Clark, 1996). On trouve aussi des organismes vivants tels que les bactéries (actinomycètes), les champignons dont leurs distribution diffèrent selon les profondeurs du sol (tab. 1) et une microfaune formée de protozoaires, des nématodes et de vers de terre (Quénéa, 2004). Par ses propriétés physicochimiques, la matière organique interagit avec les particules de sol et participe ainsi à sa structuration. La matière organique fraîche provient des déchets des organismes, de leurs sécrétions ou des tissus morts. Mais elle provient majoritairement de débris végétaux (cellulose, hémicellulose, lignine, tanins) (Chenu, 1993).

Tableau 1 : Distribution des microorganismes en fonction du sol (**Alexander, 1994**).

Profondeur (cm)	Organismes/g de sol $\times 10^3$				
	Bactéries aérobies	Bactéries anaérobies	Actinomycètes	Champignons	Algues
3-8	7800	1950	2080	119	25
20-25	1800	379	245	50	5
35-40	472	98	49	14	0,5
65-75	10	1	5	6	0,1
135-145	1	0,4	-	3	-

2.2. Phase liquide «ou la solution du sol » : Cette phase représente l'eau contenue dans le sol et dans laquelle sont dissoutes les substances solubles provenant à la fois de l'altération des roches, de la décomposition des MOS et des apports extérieurs tels que les fertilisants et pesticides. Cette fraction est le lieu des réactions chimiques permanentes indispensables. Selon **Mustin (1987)**, l'eau qui circule dans les pores du sol (eau de percolation) véhicule une grande diversité de matériels dissous ou en suspension (organiques, inorganiques, organo-minéral). Les échanges ioniques entre l'eau et le substrat solide, en particulier les argiles constituent une des fonctions du sol les plus importantes pour la nutrition végétale (**Frontier et Pichod-Viale, 1995**).

2.3. La phase gazeuse : L'air du sol contient en général les mêmes substances que l'air atmosphérique telles que N_2 , CO_2 , O_2 . Sauf que, la composition est très différente dans le sol en raison de la présence d'une activité biologique exercée par les microorganismes (**Soulas et al., 1983**). Les plus importants de ces gaz sont le O_2 provenant de l'atmosphère et le CO_2 provenant des respirations et fermentations des organismes du sol et des organes non chlorophylliens des plantes supérieures (**Frontier et Pichod-Viale, 1995**). L'air du sol contient également d'autres substances, et parfois des composés organiques volatils (NH_3 , CH_4 , H_2S) (**Calvet, 2000**).

3. Les propriétés physicochimiques du sol

3.1. Les propriétés physiques du sol

3.1.1. Structure du sol

La structure d'un sol évolue continuellement, alternant les phases de formation, de stabilisation et de dégradation. Cette formation ou dégradation de la structure résulte principalement des perturbations physiques d'origine anthropique ou climatique. Les pores créés par ces perturbations sont généralement allongés. Ainsi, le travail du sol affecte les facteurs biotiques et abiotiques du sol, soit directement en modifiant leurs propriétés structurales comme l'arrangement des vides, les agrégats, la connectivité des pores, ou indirectement en changeant les conditions d'aération, de température et de pénétrabilité du sol par les racines (**Huwe, 2003**). La structure résulte de l'équilibre entre les phénomènes de tassement, de fragmentation, d'agrégation et de déplacement du sol par le travail du sol (**Roger-Estrade et al., 2000**).

Entre autre, l'activité biologique des organismes du sol participe aussi à la formation de la structure et joue un rôle majeur dans sa stabilisation (**Oades, 1993 ; Young et al., 1998 ; El Titi, 2003**). La structure du sol agit également sur la distribution et l'activité des organismes du sol à travers son influence sur la circulation de l'eau, la distribution de la matière organique et des éléments nutritifs, fournissant des habitats favorables aux organismes du sol (**Lavelle et Spain, 2001**).

3.1.2. La Texture

La texture du sol, se définit comme la proportion des particules minérales de différentes tailles qui composent le sol. On tient compte de trois fractions : le sable, le limon et l'argile (**Hilliard et Reedyk Avril 2000**). La structure d'un sol influence toutes les autres propriétés physiques du sol, y compris le drainage, la capacité de rétention, sa température, l'aération et la structure. On peut classer les produits qui constituent la fraction minérale par diamètre décroissants (fig. 3 et 4) (**Masson, 2012**):

- Les blocs et cailloux sont les éléments de taille supérieure à 2 mm ;
- Les sables de 2 mm à 50 µm ;
- Les limons de 50 µm à 2 µm ;
- Les argiles < 2 µm

3.2. Les propriétés chimiques des sols

L'hydrogène est le cation (chargés positivement) le plus énergiquement retenu par le complexe argilo humique. Le complexe argilo humique possède la propriété de retenir à sa surface les cations de la solution du sol phénomène d'adsorption (fig. 5).

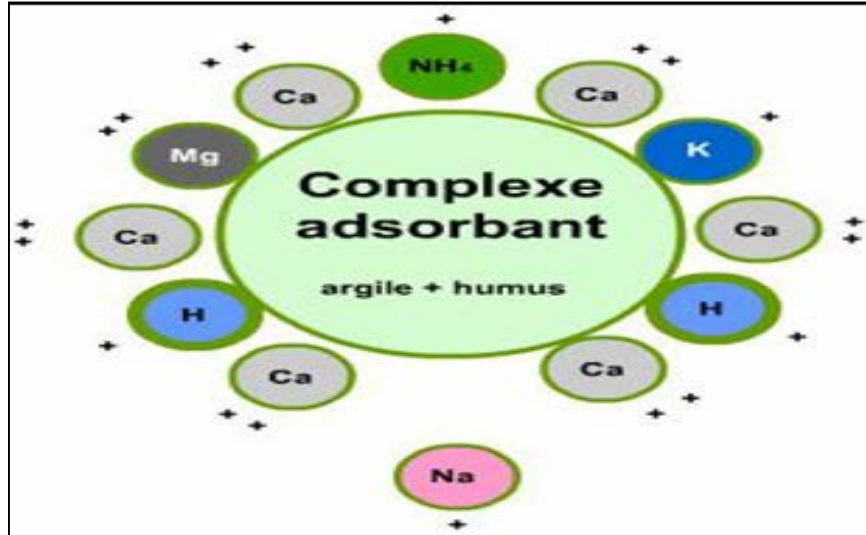


Figure 5 : Les propriétés physico-chimiques du sol (UNIFA, 2005).

Dans les eaux des sols les sels minéraux dissouts s'y trouvent dissocier et scinder en deux ions, les anions et les cations. Ces derniers sont continuellement en mouvement et représentent les éléments minéraux à l'état échangeable bio-disponibles pour la plante.

3.2.1. La couleur du sol

La couleur des sols provient le plus souvent des couleurs des oxydes de fer ou de la matière organique qui recouvrent les surfaces des particules du sol. Les surfaces des sols en couleurs foncées (noir) présentent un indicateur de la fertilité. Toutefois, la couleur de la matière organique est plus foncée brune à noir, cette couleur domine en surface que celle des oxydes de fer dont leurs couleurs varient du jaune, rouge à brune. Vers le bas, les couleurs des oxydes de fer et parfois des oxydes de manganèse sont très noirs et dominant (Wopereiset *al.*, 2008).

Les changements de couleur peuvent être considéré comme un indicateur du régime hydrique des sols. En conditions sèches et aérées la couleur du fer est rouge ou brune par contre dans les conditions inondées (peu d'oxygène) cette couleur vire vers la grise, vert-gris ou bleue (Wopereiset *al.*, 2008).

3.2.2. Matière organique du sol

La matière organique est un ensemble des composés organiques qui sont issus de résidus d'organismes à différents stade de décomposition, synthétisés par les organismes vivants ou qui sont des produits de dégradation (fig. 6) (Baldock et Skjemstad 1999 ; Krull *et al.*, 1999). La MOS contribue à la formation d'un environnement favorable pour que les organismes se développant dans le sol. Elle est une source de nutriments, elle possède une capacité de rétention de l'eau qui permet de réguler le système hydrique du sol (Rawls *et al.*, 2003). Elle agit comme un tampon contre les variations de pH et elle contribue à la structure physique du sol (Oades, 1988).

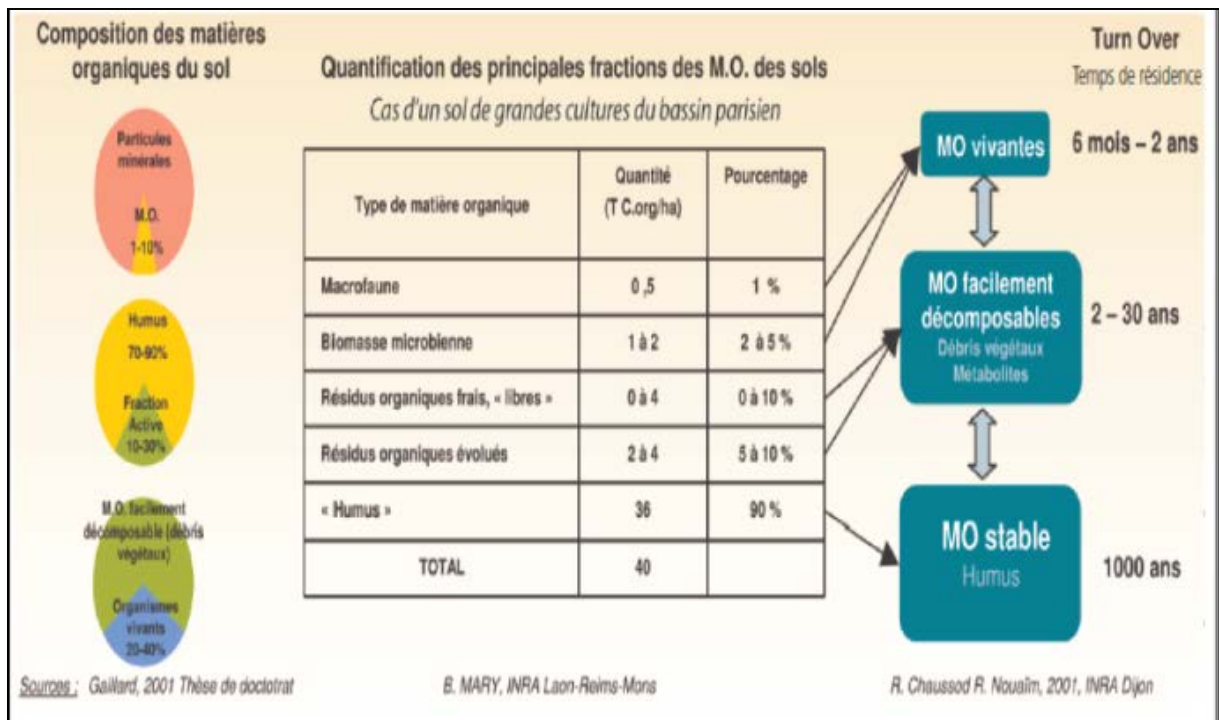


Figure 6 : Composition des MO et *turn over* (Duparque et Rigalle, 2006).

4. La microflore du sol

Les organismes vivant dans le sol se chargent de décomposer les matières organiques mortes (Anonyme, 2012), la biomasse microbienne du sol est constituée de 5 principaux groupes : les virus, les bactéries, les actinobactéries, les champignons et les algues (Lavelle et Spain, 2001; Focht et Mallin, 1979).

4.1. Les bactéries

Ce sont des procaryotes unicellulaires de formes très diverses. Leurs tailles peuvent varier entre 0,3 et 3 μm . La classification des bactéries est basée sur des caractères phénotypiques incluant par exemple la morphologie des cellules (bâtonnets, cocci, bacilles etc.), la structure

de la paroi cellulaire (Gram positif, Gram négatif), la présence d'endospores, la mobilité des cellules et la position des flagelles (**Berthelin et Toutain, 1979 ; Lavelle et Spain, 2001**). Les bactéries hétérotrophes dominant dans le sol, de part leurs consommation et minéralisation des matières organiques représentent la plupart des flux d'énergie à travers le sol (**Bakken, 1997 ; Focht et Martin, 1979, Berthelin et Toutain, 1979**).

Les bactéries interviennent dans un grand nombre de processus, et d'interactions mutualistes ou antagonistes avec les autres organismes du sol. Elles jouent des rôles fondamentaux dans les cycles de l'azote (ammonification, nitrification, dénitrification, fixation symbiotique de N₂), du carbone (décomposition et minéralisation), du phosphore, du soufre et dans le recyclage des déchets et des polluants comme les pesticides (**Toop et al., 1997; leung et al., 1997**). Elles interviennent également dans le maintien de la structure du sol, par la formation des agrégats.

4.1. Les actinobactéries

Elles forment le groupe des actinomycètes. Ce sont des bactéries filamenteuses hétérotrophes et la plupart sont des Gram-positifs. Ces bactéries possèdent un mycélium ramifié dont le diamètre varie entre 0,5 à 1,5 μ m par rapport à celui des champignons (**Berthelin et Toutain, 1979**). Leur classification est basée sur la structure de l'appareil végétative bâtonnets ou mycéliums. Ainsi, elle peut se faire aussi selon le mode de reproduction soit par fragmentation, formation de conidies végétative ou sporangiospores sexuel. Les actinomycètes sont des décomposeurs primaires des matières végétales résistantes comme les écorces, les feuilles et les tiges. Elles sont particulièrement efficaces dans la dégradation de la cellulose, de la chitine, et de la lignine. Les espèces du genre *Frankia* forment des symbioses fixatrices d'azote en associations avec les casuarinacées et d'autres plantes supérieures (**Lavelle et Spain, 2001; Normand et al., 2000; Stolp, 1988**).

Ces bactéries ont aussi d'autres capacités métaboliques très importantes, comme la production de pigments et d'antibiotiques (**Stolp, 1988**).

4.3. Les champignons

Les champignons sont des eucaryotes dotés d'une structure filamenteuse végétative appelée mycélium. La plupart sont des Eumycètes, ils ont une membrane chitineuse, et leurs organes reproducteurs sont dépourvus de flagelles. Les Eumycètes sont constitués de quatre principaux groupes qui diffèrent par la structure de leur mycélium et de leur organe reproducteur survivant dans le sol on trouve les Zygomycètes, les Ascomycètes, les Basidiomycètes et les deutéromycètes (**Lavelle et Spain, 2001**). La majorité des grands groupes taxonomiques de champignons sont tous hébergés dans le sol (**Thorn, 1997**). Elles

présentent une grande diversité, des études récentes estiment le nombre d'espèces à 1,5 millions approximativement

(Hawksworth et Mound, 1991).

Les champignons jouent des rôles dans le recyclage des déchets, des sécrétions chimiques et excréments des racines des plantes, des animaux et des microorganismes), dégradation des débris organiques de grande taille et des composés de structures complexes **(Moore et de Ruiter, 1991 ; De Ruiter et al., 1993)**. De nombreux travaux indiquent la prédominance de : *Mucor*, *Trichoderma* et *Aspergillus*, alors que les *Rhizopus*, *Fusarium*, *Zygorhynchus*, *Cephalosporium*, *Cladosporium* et *Verticillium* sont couramment isolés

5. Les fonctions multiples du sol

Le sol assure de nombreuses fonctions tels que :

- support des cultures agricoles et forestières ;
- stockage, filtration et épuration de l'eau ;
- stockage du carbone ;
- source de matières premières ;
- habitat pour la faune et la flore.

Dans le sol, les matières organiques assument de nombreuses fonctions agronomiques et environnementales (fig. 7).



Figure 7 : Rôles et fonctions des MO du sol **(Duparque et Rigalle, 2011)**.

Chapitre II

II. Les actinobactéries et les *Streptomycetes*

1. Caractéristiques principales des actinobactéries

Les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positive (Nanjwad *et al.*, 2010). Dans cet ordre le coefficient de Chargaff (G+C) est varié entre 55 à 75 % (Dhananjeyan *et al.*, 2010). Lorsqu'ils évoluent sur un substrat solide, comme la gélose, ils se développent sur la surface et à l'intérieur du milieu de culture (Prescott, 2010). Ce qui explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants » (Gottlieb, 1973). Tout comme les eucaryotes multicellulaires, les actinomycètes sont des hétérotrophes à l'exception de certaines espèces qui sont capables de chimio-autotrophie. Ils possèdent un cycle de vie qui résulte de trois processus physiologiques majeurs : la croissance végétative, la différenciation et la sénescence cellulaire puis la mort. Ils ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries, le temps de génération moyenne est environ 2 à 3 heures *in vivo* (Beckers *et al.*, 1982 ; Danilenko *et al.*, 2005). Les actinomycètes présentent une source importante des antibiotiques qui jouent un rôle essentiel dans les différents domaines pharmaceutique et l'amélioration alimentaire.

2. La morphologie

La morphologie des différents groupes d'actinobactérie est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium végétatif (de substrat) se développant sur et dans les milieux ou aérien mycélium au-dessus du substrat. Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporangium ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridées etc. soit isolées soit groupées en chaînes (Perry *et al.*, 2004).

2.1. Mycélium primaire

Le mycélium primaire est dénommé mycélium végétatif, mycélium de substrat ou mycélium intramatriciel. L'ensemble des filaments est constitué des hyphes et des spores dont leur croissance est apicale et se forme à partir du tube germinal (Larpent et Sanglier, 1989 ; Mighélez *et al.*, 2000 ; Prescott *et al.*, 2010).

2.2. Mycélium secondaire

Le mycélium secondaire est nommé mycélium aérien, il se forme lorsque la colonie sera plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Ce mycélium est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur un milieu pauvre en sources nutritionnelles (Larpent et Sanglier, 1989 et Mighélez *et al.*, 2000). Chez certains actinomycètes, les hyphes

végétatifs lorsqu'ils se différencient en hyphes aérien, c'est à ce moment-là que les substances médicamenteuses sont synthétisés (Prescotte *et al.*, 2010).

2.3. Sporulation d'actinobactéries

Les spores des actinobactéries résultent d'une série de changements et de développement des hyphes aériens, ils s'organisent en diverses structures tels que :

Conidies : Les conidies des actinobactéries sont des spores exogènes asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations monosporés, oligosporés ou polysporés (fig. 9) (Holt *et al.*, 1994).

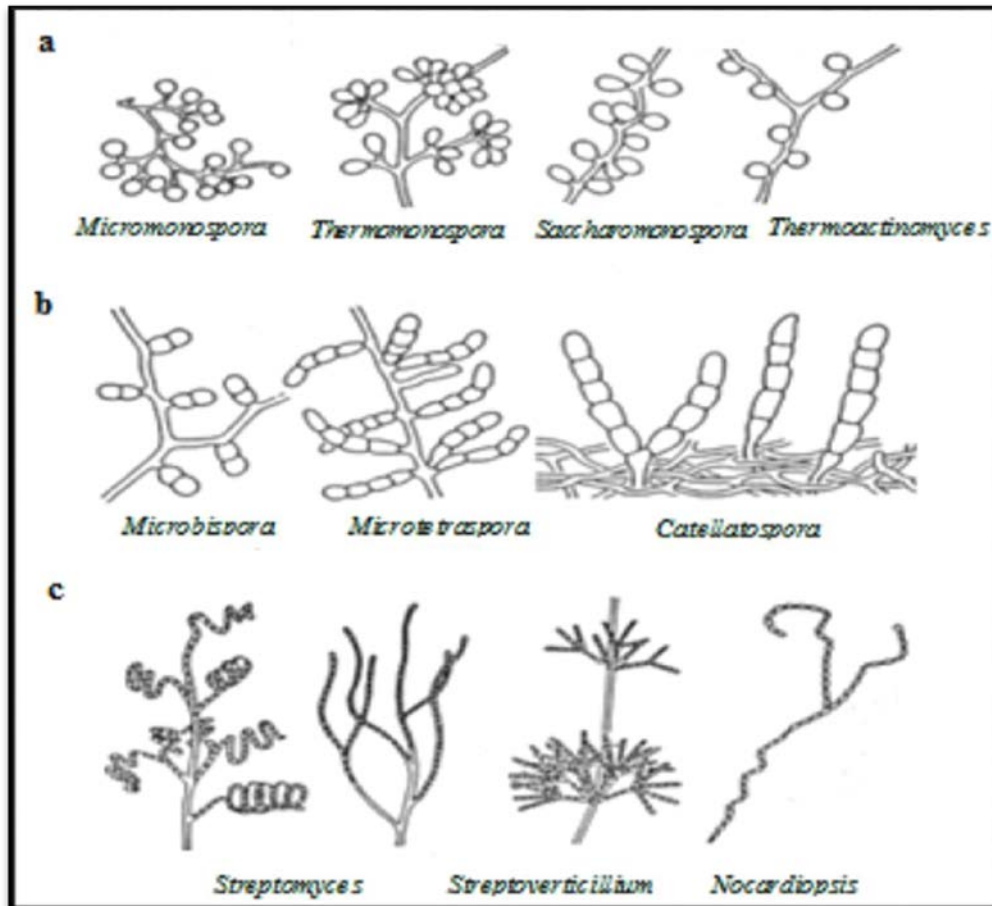


Figure 9 : Type de formation des spores exogènes des actinomycètes (Streptomyces et streptovercillium) (Iarpen et Sanglier, 1989).

- a) Monosporés,
- b) Oligosporés
- c) Polysporés

Sporanges : Les sporanges nombreux ou limités, sont des sacs contenant des endospores, ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien ou à l'intérieur du milieu solide (fig. 10) (Holt *et al.*, 1994).

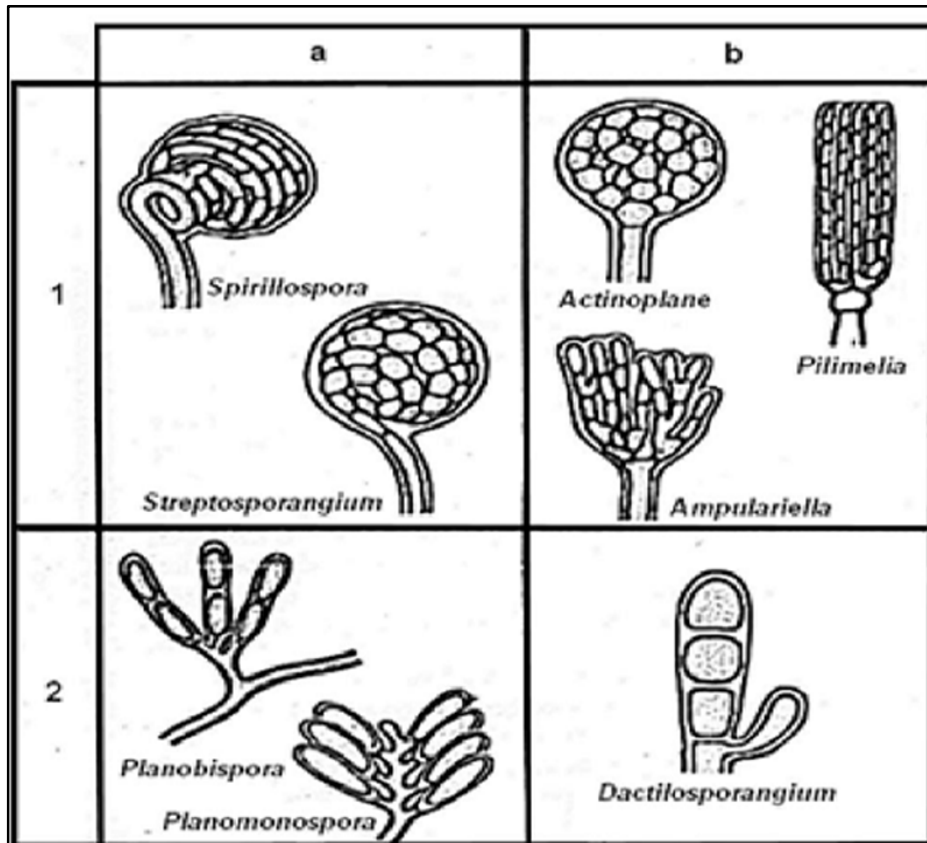


Figure 10 : Type des sporanges chez quelques genres d'actinobactéries (Larpen et sanglier, 1989)

- a) Sur le mycélium secondaire,
- b) Sur le mycélium primaire,
- 1. Spores nombreuses,
- 2. Spores en nombres limités.

3. Importance des actinobactéries

3.1. Production d'enzymes

Les actinobactéries sont capables de synthétiser certaines enzymes d'intérêts industriel telles que les chitinases, des glucanases, des peroxydases et des glutaminases ((Tokala *et al.*, 2002 ; Divya Teja *et al.*, 2014). Des amylases, des cellulases et des hémi-cellulases peuvent être aussi produites par quelques espèces de *Streptomyces*. Toutefois, l'espèce *Streptosporangium* sp. isolé à partir des feuilles de maïs produit des glucoamylases exploitées en industrie afin de dégrader l'amidon, d'autres sont capables de dégrader la lignine. Les lipases sont aussi produites par certaines souches actinomycétales, ces enzymes catalysent l'hydrolyse des triglycérides en diglycérides, monoglycérides, glycérol et en acides gras (Sommer *et al.*, 1997 ; Hasegawa *et al.*, 2006).

3.2. Production d'antibiotique

De nombreuses substances antimicrobiennes sont synthétisées par les microorganismes du sol environ 23000 métabolites secondaires bioactives qui jouent un rôle antagoniste important. Entre autre, 10000 de ses substances sont produites par les actinobactéries représentant 45%. Les espèces du genre *Streptomyces* produits environ 7600 de métabolites bioactives dont la plupart sont des antibiotiques qui sont exploités par les industries pharmaceutiques (tab. 2) (Valli et al., 2016). D'autres produits sont synthétisés également par ses micro-organismes comme l'acide indole acétique (AIA) et les sidérophores, ils peuvent aussi solubiliser le phosphore du sol (Riedlinger et al., 2006 ; Ben Ameer et al., 2006).

Tableau 2 : Liste de certains antibiotiques produits par *Streptomyces sp.* (Hasani et al., 2014).

<i>Streptomyces sp.</i>	Antibiotic	<i>Streptomyces sp.</i>	Antibiotic
<i>S. orchidaceus</i>	Cycloserin	<i>S. erythraeus</i>	Erythromycin
<i>S. orientalis</i>	Vancomycin	<i>S. versuella</i>	Chloramphenicol
<i>S. fradiae</i>	Neomycin, Actinomycin, Fosfomycin, Dekamycin	<i>S. aureofaciens</i>	Chlortetracycline, Dimethylchlor tetracycline
<i>S. nodosus</i>	Amphotricin B	<i>S. ambofaciens</i>	Spiramycin
<i>S. noursei</i>	Nistatin	<i>S. avermitilis</i>	Avermectin
<i>S. mediterranei</i>	Rifampin	<i>S. alboniger</i>	Puromycin
<i>S. griseus</i>	Streptomycin	<i>S. niveus</i>	Novobicin
<i>S. knanamycticus</i>	Kanamycin	<i>S. platensis</i>	Platenmycin
<i>S. tenebrarius</i>	Tobramycin	<i>S. roseosporus</i>	Daptomycin
<i>S. spectabilis</i>	Spectinomycin	<i>S. ribosidificus</i>	Ribostamycin
<i>S. viridifaciens</i>	Tetracycline	<i>S. garyphalus</i>	Cycloserine
<i>S. lincolensis</i>	Lincomycin, Clindamycin	<i>S. vinaceus</i>	Viomycin
<i>S. rimosus</i>	Oxytetracyclin	<i>S. clavuligerus</i>	Cephalosporin

4. Caractéristiques principales de genre Streptomyces

Les espèces du genre *Streptomyces* sont des bactéries Gram positives aérobies chimio-organotrophes et se produisent dans les mêmes habitats que les champignons. Ils sont superficiellement similaires et présentent des mycéliums végétatifs abondamment ramifié et des mycéliums aériens formant des chaînes de spores plus ou moins nombreuses. Les filaments et les spores sont très petits, le diamètre est

de 0,5 à 2 μm généralement. Les spores sont portées en ligne droite, ondulée ou hélicoïdale. Ils ont des génomes à haute teneur en GC 69- 78% (Chater, 1993 ; Ikeda *et al.*, 2003 ; Prescott *et al.*, 2010 ; Willemse *et al.*, 2011).

Les colonies sont à croissance lente et ont souvent une odeur semblable au sol en raison de production d'un métabolite volatil la géosmine. Ils forment des colonies bien distinctes à l'aspect de cuir ou butyreuses, souvent pigmentées et utilisent comme aliment de nombreux composés organiques. Les espèces de *Streptomyces* sont non-mobiles, la catalase positive, transformes des nitrates en nitrites et dégrades l'adénine, l'esculine, la caséine, la gélatine, l'hypoxanthine, l'amidon et la tyrosine. Le peptidoglycane de la paroi cellulaire contient des quantités importantes d'acide L-diaminopimélique (L-DAP), et des acides gras saturés (hexa- ou octahydrogénés), par contre l'acide mycolique existe à des faibles quantités. Des lipides polaires complexes, avec des motifs qui contiennent typiquement du diphosphatidyl glycérol, de la phosphatidyléthanolamine, du phosphatidylel'inositol et le phosphatidyl inositol mannosides (Jüttner et Watson, 2007 ; Smaoui, *et al.*, 2011).

5. Classification de *Streptomyces*

La classification des espèces chez la *Streptomyces* est généralement basée sur des critères morphologiques, physiologiques et chimiques des parois cellulaires (George *et al.*, 2004). Le streptomycète est classé dans le taxon suivant.

- Phylum : Actinobacteria
- Classe : Actinobacteria
- Sous-classe : Actinobacteridae
- Ordre : Actinomycetales
- Sous-Ordre: Streptomycineae
- Famille : Streptomycetaceae
- Genre : Streptomyces

6. L'habitat de *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont largement distribués dans le sol, l'eau et d'autres milieux naturels, les populations de ces écosystèmes sont déterminées par de nombreux facteurs physiques, chimiques et biologiques. L'identification de nouveaux systèmes écologiques est déterminante pour la découverte de nouveaux *Streptomyces* (Wang *et al.*, 1999 ; Seong *et al.*, 2001 ; Singh *et al.*, 2006 ; Kharat et Hardikar, 2009).

Les streptomycètes constituent 40% des bactéries du sol. Dans des conditions sévères sèches et alcalines du sol de nombreuses populations existent sous forme filamenteuse, ils provoquent la

résistance de la texture du sol et le protègent du vent et de la sécheresse. Le pourcentage de *Streptomyces sp.* dans la population microbienne totale a une corrélation positive avec la profondeur du sol et ils peuvent même être obtenus à partir de l'horizon C du sol (fig. 10) (Boone *et al.*, 2001 ; Kim *et al.*, 2004 ; Vetsigian et Roy, 2011).

La distribution des *Streptomycètes* dans l'eau et le sol dépend du stress alimentaire, température, pH, l'humidité, salinité, texture du sol et du climat (Locci, 1989 ; Mokrane, *et al.*, 2013).

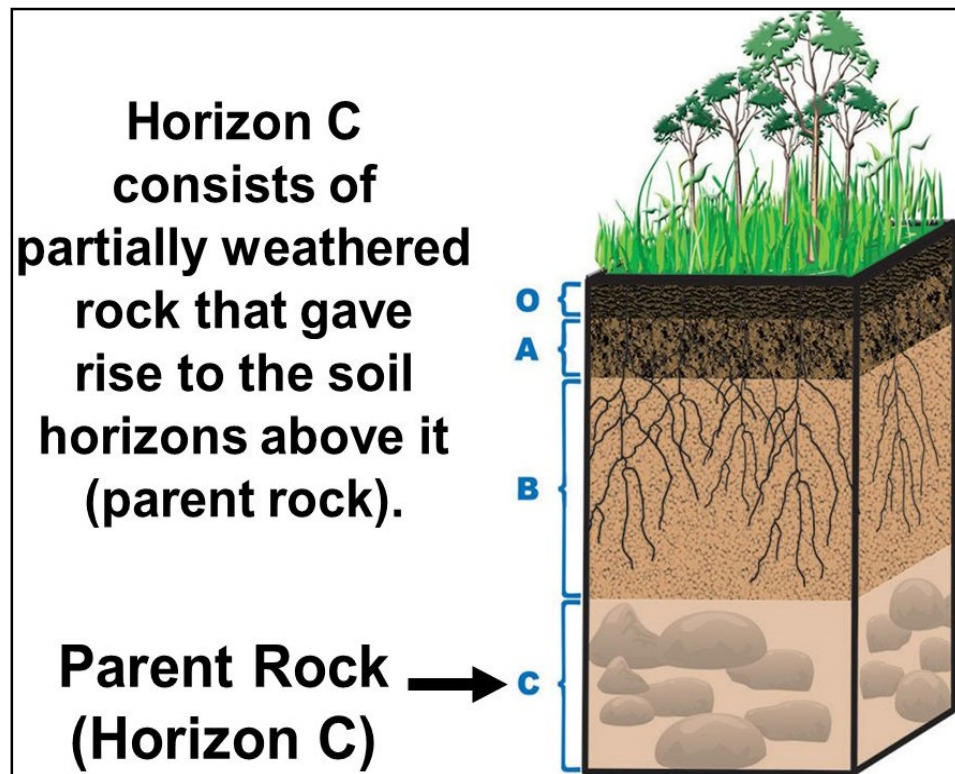


Figure 10 : les horizons d'un profil du sol (Antoni *et al.*, 2008).

7. Cycle de vie de *Streptomycete*

7.1. Dans un milieu solide

Grâce aux méthodes de cytogénétiques, le cycle de vie d'un *Streptomyces sp.* a été étudié et décrit par plusieurs chercheurs. Quand les spores des Streptomycètes se trouvent dans un milieu riche en éléments nutritifs, leur cycle de vie se déclenche, ce qui va stimuler la germination et la formation des tubes germinales. L'extension et la ramification des tubes germinatifs donnent naissance à un réseau de filaments qui se développent dans et à travers la surface d'un milieu solide. Ce réseau est appelé le mycélium substrat (MS). Au fur et à mesure que la colonie mycélienne commence à se différencier au centre, cette différenciation entraîne la formation des hyphes aériens multi-génomiques. La croissance

de ses derniers s'arrête, quand les hyphes prennent la forme spirale (fig. 11). Les hyphes subissent une division cellulaire monoploïde dont chacune se développera en une spore résistante, ces spores sont des agents de dissémination (Kieser *et al.*, 2000 ; Flärdh et Buttner, 2009 ; Mc Gregor, 1954 in Hasani *et al.*, 2014 et Alt Barka *et al.*, 2016).

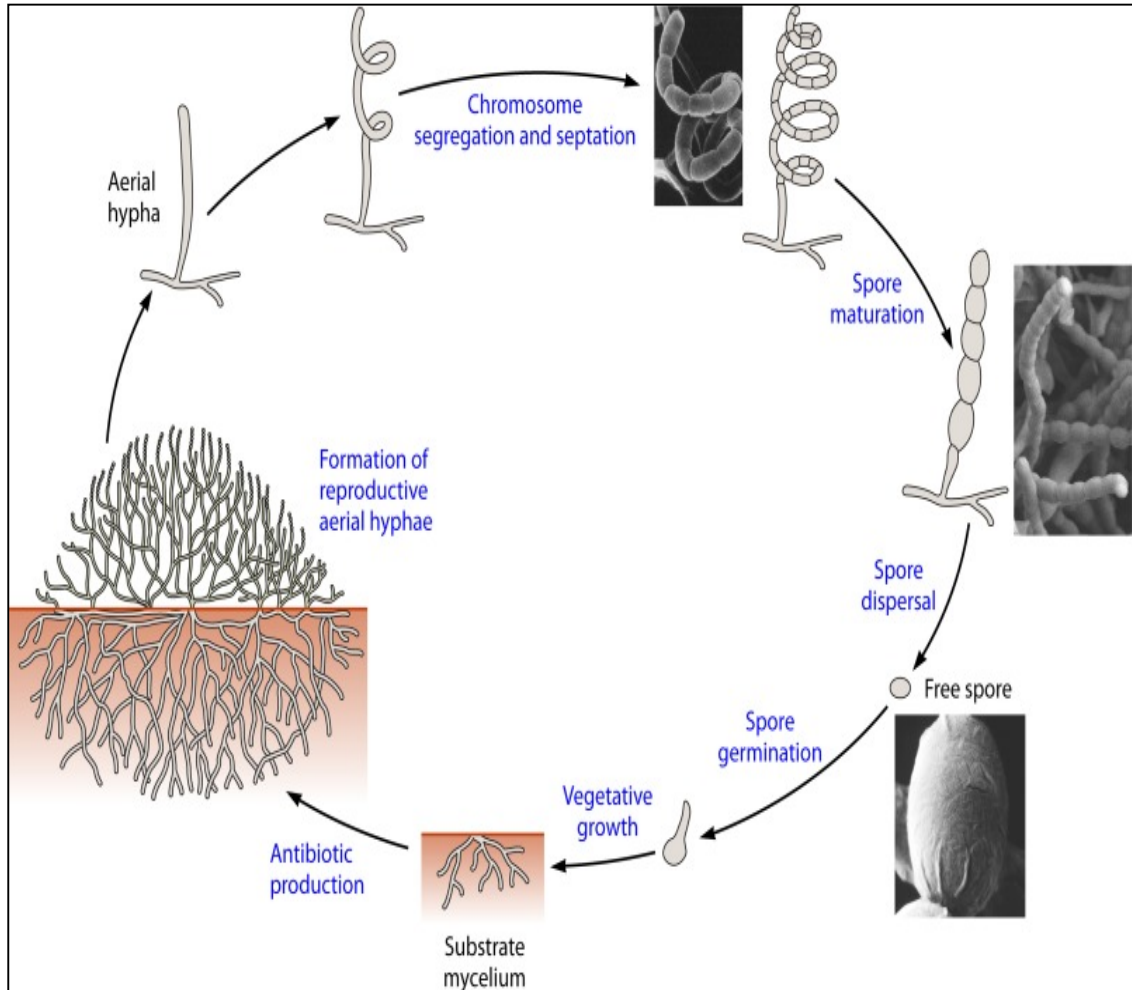


Figure 11 : cycle de vie de sporulation des actinobactéries sur milieu solide (Alt Barka *et al.*, 2016).

7.1. Dans un milieu liquide

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire (MP), même si certaines souches peuvent sporuler dans cet environnement (Madigan et Martinko, 2007). Elle nécessite une aération du milieu par agitation, et ou par injection d'air puisque ces bactéries sont aérobies strictes. Les Streptomyces croissent par élévation des filaments et peuvent par la suite

présenter trois types de morphologies (filaments dispersés libres ou en agrégats ; filaments pellets) (fig. 12) (Saffroy, 2006).

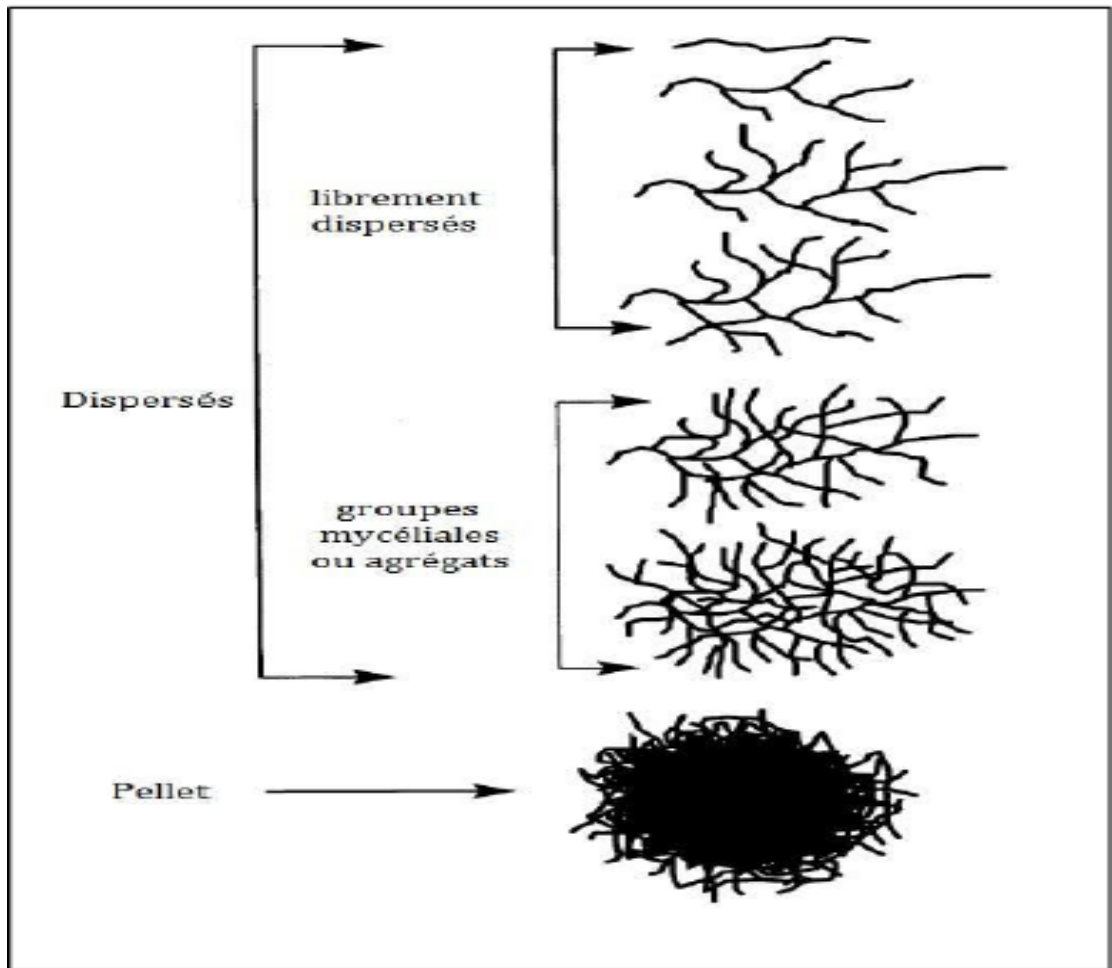


Figure 12 : Morphologie rencontrées aux cours de culture liquide de *Streptomyces* (Olmoset *et al.*, 2013).

Chapitre III

III. Les antibiotiques

1. Définition

Un antibiotique du grec (*anti*, contre et *bios*, la vie) est une substance chimique naturelle ou synthétique produites par les micro-organismes qui a le pouvoir d'inhiber leur croissance ou détruire les bactéries et d'autres micro-organismes (**Larpen et Sanglier, 1989**).

De plus, il existe des antibiotiques semi-synthétiques, qui sont en fait des antibiotiques naturels modifiés par l'addition de groupements chimiques dans le but de les rendre moins sensibles à l'inactivation par les micro-organismes (**Prescott *et al.*, 2010**). Toutes les substances antibiotiques ne sont pas indistinctement actives sur les différents types de microorganismes. Les antibiotiques antibactériens sont actifs contre les bactéries et les ATB antifongiques contre les champignons unicellulaires. Il est possible selon cette définition d'assimiler aux ATB des substances actives sur les virus (antiviraux) et des substances actives sur les parasites (antiparasitaires). Rappelons également que certaines molécules ATB peuvent avoir des activités multiples (tab. 3) (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Tableau 3 : Quelques exemples d'ATB à activités multiples (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Antibiotiques	Type d'activité
Adriamycine	Anticancéreux, antibactérien (Gram + et Gram -)
Chloramphénicol	Antibactérien (Gram+, Gram-, rickettsies)
Erythromycine	Antibactérien (Gram+, mycobactéries), antiviral
Métronidazole	Antibactérien (bactéries anaérobies stricte), Antiparasitaire (Trichomonas, amibiase)
Mitomycine C	Antibactérien (Gram +, Gram-, mycobactéries), Antitumoral, Antiviral
Tétracyclines	Antibactérien (Gram +, Gram-, intracellulaires), Antitumoral,
Rifamycines	Antibactérien (Gram +, mycobactéries), Antitumoral

2. La nature chimique des ATB

D'après, **Larpen et Sanglier(1989)**, les ATB sont constitués de molécules cycliques dont leurs structures sont plus ou moins complexes et très variées. Diverses classifications sont possibles selon le type de structure, on peut distinguer quatre principaux types :

- Les ATB osidiques tels que les holosidiques comme les aminosides par exemple : streptomycine, Kanamycine et les hétérosidiques tels que, les macrolides (erythromycine), les lincomycines, les antifongiques (nystatine) etc.
- Les ATB 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 quinolonesou à un polypeptide (les polymyxines).
- Les ATB de nature lipidiques par exemple l'acide fusidique.
- Les ATB comportant des cycles condensés comme les tétracyclines.

3. Classification des ATB (les familles)

On a 5 grandes familles des antibiotiques qui ont été classés selon plusieurs critères (fig. 13)

(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 caractère de résistance bactérienne
- Leurs effets secondaires

3.1. Les β - lactamines

Les bêtalactamines 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 (**Laurent, 2009**).

3.2. 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**).

3.3. Les aminosides

Leur structure est à base de sucres aminés,les principales molécules sont : Streptomycine, Gentamicine, Netilmicine, Tobramycine, Amikacine. est un antibiotique bactéricide. Ils se fixent de façon irréversible sur le ribosome des bactéries et inhibent la traduction en provoquant des erreurs de lecture de l'ARN messager (**Archambaud, 2009**)

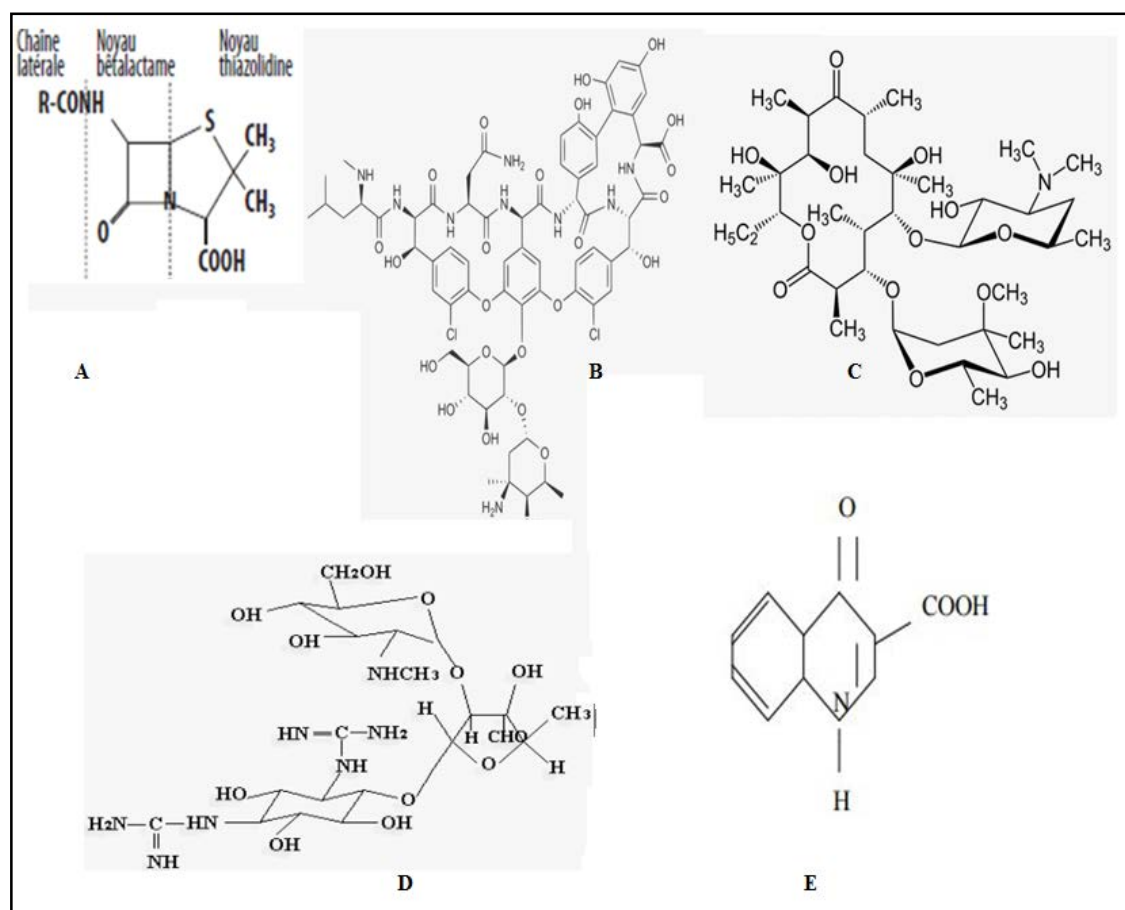


Figure 13 : Les structures chimiques des cinq grandes familles des antibiotiques (**Prescott *et al.*, 2010**). A : Les β - lactamines (pénicillium) ; B : Les glycopeptides ; C : Les aminosides (stréptomycine) ; D : les macrolides (erythromycine) ; E : Les quinolones

3.4. Les 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 (**Madigan et Martinko, 2007**).

3.5. Les quinolones

Les quinolones sont des antibiotiques bactéricides à large spectre, ils sont très efficaces contre les bactéries entériques, et d'autres bactéries pathogènes. Ils sont utilisés dans le traitement des infections du système urinaire (**Prescott *et al.*, 2007**).

4. Mode d'action

Selon Ferron (1984), le mode d'action des ATB diffère selon leurs sites d'action et leurs groupes (fig.14). Chaque famille des antibiotiques présente un mécanisme d'action selon la cible. Elles ne

sont pas toujours connues avec précision et correspondent à 6 niveaux différents de la cellule bactérienne ou fongique : la paroi, la membrane cytoplasmique, le génome (réplication et transcription ADN), la traduction du ARN messenger (synthèse des protéines), le métabolisme respiratoire et intermédiaire (**Larpen et Sanglier, 1989**).

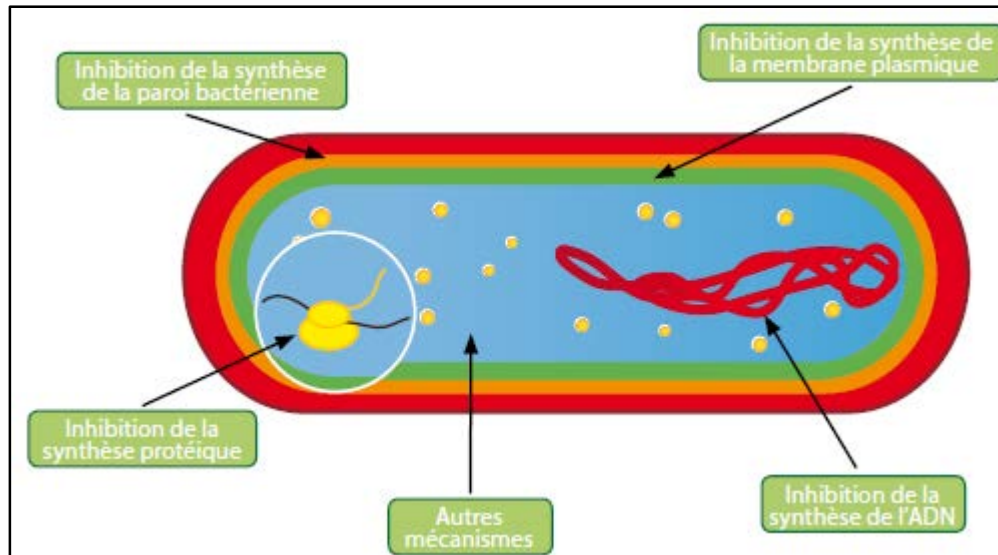


Figure 14 : Mode d'action des antibiotiques (**Wendpagnagdé et Rachel, 2005**).

4.1. Action sur la paroi

Selon **Talbert et al, (2009)**, quelques ATB peuvent inhiber certaines molécules qui interviennent dans la synthèse des parois bactérienne telles que :

- Les β -lactames, qui inhibent la transpeptidase intervenant dans la synthèse de la paroi ;
- Les glycopeptides, qui se lient à un intermédiaire de synthèse ;
- Les fosfomycines, provoquent l'accumulation de précurseurs du peptidoglycane sous forme monomère.

4.2. Action sur la membrane cytoplasmique

Certaines molécules des ATB telles que la polymyxine et la tyrocidine produites par des bactéries du genre *Bacillus* peuvent perturber la perméabilité sélective des membranes en formant des canaux, entraînant la perte des cations monovalents. Par conséquent, la pompe de proton motrice des membranes cytoplasmiques des microorganismes sera modifiée ou bloquée, transportant vers l'intérieur ou l'extérieur des cellules endommagées (**Perry et al., 2002**).

4.3. Action sur des acides nucléiques

La réplication de l'ADN peut être inhibée par certaines molécules des ATB, comme les quinolones et les fluoroquinolones bloquant la sous-unité de l'enzyme gyrase. Toutefois, la sous-

unité ² de l'ARN-polymérase bactérienne responsable de la transcription peut être bloquée par la Rifampicine (Lavigne, 2007). Les sulfamidés agissent sur la synthèse de l'acide folique qui est un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques des acides nucléiques. Leur spécificité d'action provient du fait que les eucaryotes ne synthétisent pas d'acide folique (Herchuelz, 2006a, 2007).

4.4. Action sur la synthèse protéique

La sous-unité 50S des ribosomes (site P) peut se lier de façon réversible avec les macrolides en inhibant la transpeptidation et la translocation (fig.15). Lorsque les aminosides se fixent sur la sous-unité 30S du ribosome des concentrations sub thérapeutiques provoquent des erreurs dans le cadre de lecture par contre à des concentrations thérapeutiques inhibent l'élongation de la chaîne peptidique en bloquant le complexe d'initiation. Le chloramphénicol s'attache à la sous-unité 50S (site A) en empêchant l'attachement de l'Amino-acyl-ANRtau site A du ribosome. Les tétracyclines se fixent réversiblement à la sous-unité 30S des ribosomes empêchant la liaison des Aminoacyl-tRNA au site A du ribosome. Les enzymes impliqués dans la synthèse des purines et de certains acides aminés essentiels sont inactivés par l'antibiotique cotrimoxazole (Lavigne, 2007).

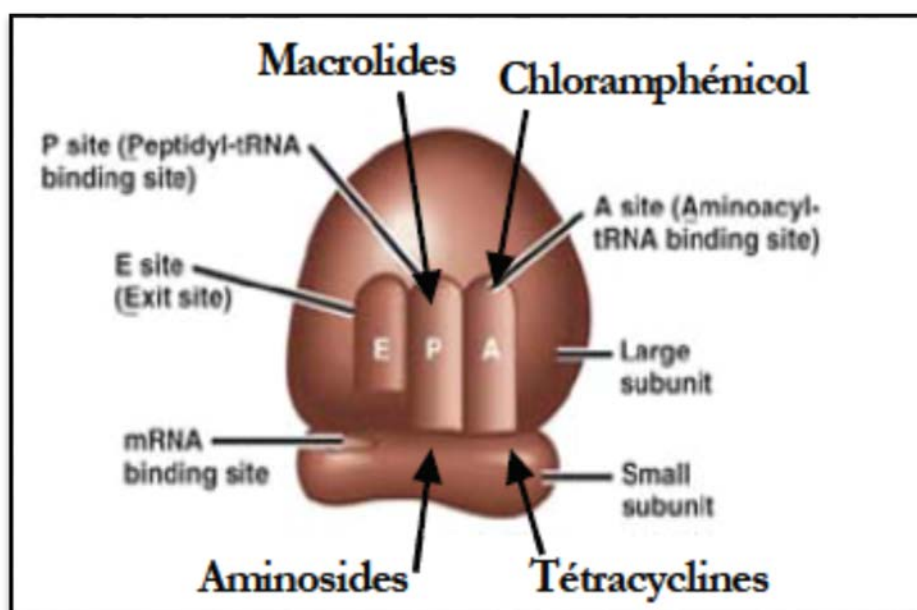


Figure 15 : Les actions des ATB sur la synthèse des protéines (Lavigne, 2007).

5. Résistance des bactéries à l'ATB

Selon Asselineau et Zatlá (1973), et Muylaret et Mainil, (2012), la résistance des souches bactériennes à l'action des antibiotiques réside dans l'usage thérapeutique. Ces résistances basées sur différents critères génétiques, biochimiques, microbiologiques et cliniques (fig. 16).

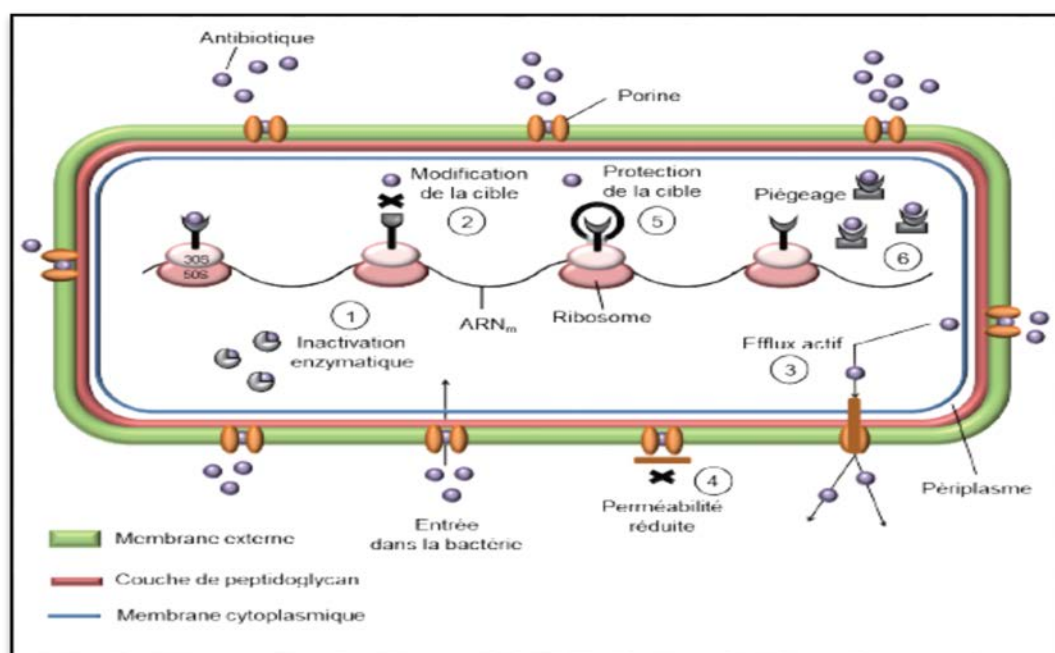


Figure 16 : Les différents mécanismes de résistance aux antibiotiques dans une bactérie Gram négative, adapté de **Guardabassi et Courvalin (2006)**.

5.1. La résistance naturelle

Les différentes espèces bactériennes ou fongiques se montrent spontanément résistants vis-à-vis de certains antibiotiques, à titre d'exemple les bacilles Gram- résistants vis-à-vis la pénicilline G, les cocci Gram+ résistants aux polymyxines (**Asselineau et Zatta, 1973**). Elle est d'information génétique chromosomique et sur le plan biochimique deux principaux mécanismes participent : l'imperméabilité de la cellule et l'absence de cible moléculaire (**Larrent et Sanglier, 1989**). L'espèce *Klebsiella sp.* produit naturellement des bêta-lactamases. Cette enzyme est alors présente dans l'espace périplasmique de la bactérie et conduit à la destruction d'antibiotiques comme les pénicillines A, avant que ceux-ci ne puissent atteindre leur cible bactérienne (**Lozniewski et al., 2010**).

5.2. Résistances acquises

D'après **Larrent et Sanglier (1989)**, la résistance acquise est due soit à la modification de gènes chromosomiques résistance par mutation chromosomique soit à l'acquisition des gènes plasmidiques ou résistance extra-chromosomique.

5.3. Résistance croisée

Un germe devenu résistant à un antibiotique peut devenir résistant à un autre antibiotique. Les bactéries présentent une résistance chromosomiques vis-à-vis les antibiotiques qui procèdent des structures chimiques voisine. Dans la résistance croisée on peut trouver aussi les résistances extra-chromosomiques qui variables à l'intérieur d'une même classe. On peut distinguer une résistance réciproque (double sens) ou unilatérale (sens unique) (**Asselineau et Zatlá, 1973**).

6. Les effets chimio-thérapeutiques et vétérinaires des antibiotiques

Le rapport bénéfice/risque de l'utilisation des antibiotiques en tant que médicaments chez l'homme et l'animal autorise la réduction de manière spectaculaire la morbidité et la mortalité de nombreuses maladies infectieuses d'étiologie bactérienne (**Polard, 2006 ; Doublet et al., 2012**). Ces substances sont des agents chimiothérapeutiques avec des propriétés caractéristiques qui orientent leurs utilisations dans des circonstances précises. On distingue dans un premier lieu les propriétés antibactériennes qui sont capable de détruire les bactéries avec une dose plus élevé (effet bactéricides) soit d'arrêter la multiplication avec faible dose (effet bactériostatique). En second, les propriétés pharmacocinétiques (le spectre d'activité) qui correspondent aux taux sériques, demi-vie d'élimination, taux de fixation aux protéines, diffusion tissulaire. Enfin, la toxicité correspond à la toxicité aiguë, toxicité chronique (**Larpen et Sanglier, 1989**).

En médecine vétérinaire, l'utilisation des ATB contre certaines infections respiratoires ou digestives dans le cas de l'animale mammité telle que la vache ou encore chez les veaux, présente des sujets de maladies, qu'il faut prévenir ou traiter pour assurer leur bonne santé. Les viandes mises sur le marché ne présentant aucun risque pour la santé du consommateur peuvent être commercialisé ou abattus si ses viandes viennent des animaux malades (**Pierre, 2014**). Les ATB peuvent être utilisés comme additif alimentaire, c'est-à-dire ajouté à faible dose dans l'alimentation animale. Cela peut avoir un effet préventif sur certaines infections bactériennes et modifier la composition de la microflore intestinale qui va permettre une meilleure assimilation de ses aliments et une augmentation de la vitesse de croissance de ses animaux (**Sanders, 2005**). D'autre part, les ATB peuvent présenter des inconvénients comme les bêtalactamines qui provoquent des réactions d'hypersensibilité immédiate ou croisées, en plus des maladies pseudo-sériques. Les fluoroquinolones ont des effets sur les tendons, la peau et la fonction cardiaque. Toutefois, les macrolides sont la cause principale des troubles gastro intestinaux (**Polard, 2006**).

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

V. Matériel et méthodes

1. L'objectif global

L'objectif principal de ce travail est basé sur l'utilisation d'un microorganisme « les actinobactérie du genre *Streptomyces* » isolé d'un sol foresterie de la région de Mostaganem, dont le but de produire une substance bioactive « streptomycine ».

2. Protocole expérimental général

Le protocole expérimental est constitué de plusieurs étapes (fig.17). Ces différentes étapes englobent des multiples objectifs tels que :

1. Les sites de l'échantillonnage des sols ;
2. L'isolement et la purification des bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces* ;
3. Identification de la souche bactérienne par des tests physiologiques et biochimiques ;
4. Tests antagonistes des isolats d'actinomycètes vis-à-vis des souches pathogène *E. coli* et *S. aureus* ;
5. La fermentation submergée des isolats d'actinomycètes dans un milieu nutritif liquide spécifique Bennett et extraction liquide –liquide des antibiotiques et des huiles ;
6. Test antibiogramme des antibiotiques par la technique de diffusion dans un milieu solide (méthode de disque).

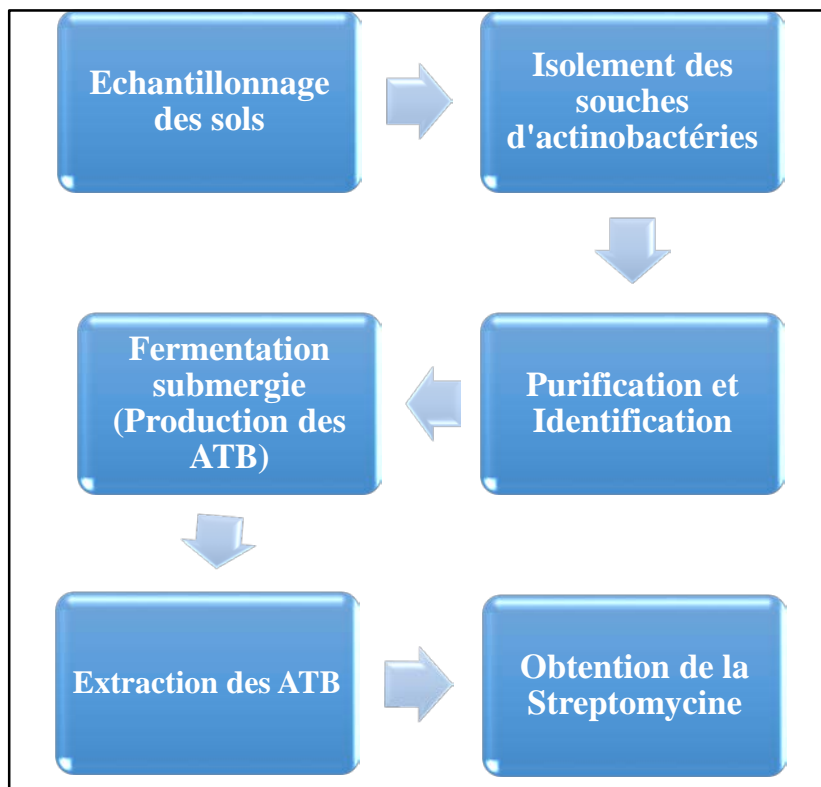


Figure 17 : Protocole expérimental général.

3. Sites de prélèvement de l'échantillon

Le choix du site des prélèvements des échantillons a porté sur des sols forestiers de la région Ouillis (Abdelmalek Ramdane) de la wilaya de Mostaganem. Ce site est situé à $36^{\circ} 06'21.23''$ Nord et $0^{\circ} 16'23.43''$ Est, il présente une superficie de 75 km^2 , la température journalière est de 21°C , avec une humidité de 56 % (fig18). Les prélèvements ont été effectués le 13 avril 2017.



Figure 18 : Site des prélèvements des échantillons région de Ouillis (Mostaganem);

A : Carte géographique du site (photo satellite)

B : La zone de prélèvement dans la forêt de Ouillis (photo prise le 13/04/2017).

Trois échantillons sont prélevés aseptiquement à une profondeur d'environ 25 cm (fig19). 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. 18 B et 19).



Figure 19 : Les points des prélèvements des échantillons.

4. Isolement des actinomycètes (streptomycète)

4.1. Prétraitement des échantillons

Le prétraitement des échantillons permet de réduire la croissance de la flore fongique et bactérienne, afin, d'augmenté le nombre des actinobactéries contenue dans le sol. Plusieurs prétraitements existent tels que le séchage à la température ambiante pendant une semaine ou l'utilisation 1/10 du CaCO_3 avec une incubation à 26-30°C pendant 2 jours. Ce dernier prétraitement a été retenu vue son efficacité (Arshad *et al.*,2012; Suwan *et al.*, 2012 ; Saravana *et al.*, 2012).

4.2. Les Milieux de culture

Les actinobactéries peuvent être isolés sur plusieurs milieux de culture (liquides ou solides). Parmi ces milieux on a :

- Milieu amidon caséine agar (Kuster et Williams, 1964) ;
- Milieu de Bennett (Jones, 1949 ; Wakisaka, 1982 in Bastide, 1986) ;

La composition de ces milieux est présentée dans l'annexe 1, elle doit être additionnée des antibiotiques soit des antifongiques ou/et des antibactériens Gram⁻ tels que la cycloheximide (50µg/ml), nystatine (30 µg/ml), streptomycine (10mg/l) et chloramphénicol (25mg/l) (Williams et Davide, 1965 in Bastide, 1986). Chaque antifongique se prépare dans un solvant approprié comme l'acétone pour la cycloheximine et l'eau distillée pour nystatine.

4.3 Préparation de la suspension de dilution et ensemencements

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 de dilutions décimales jusqu'à 10^{-5} (fig. 20) dans l'eau physiologique stérile.

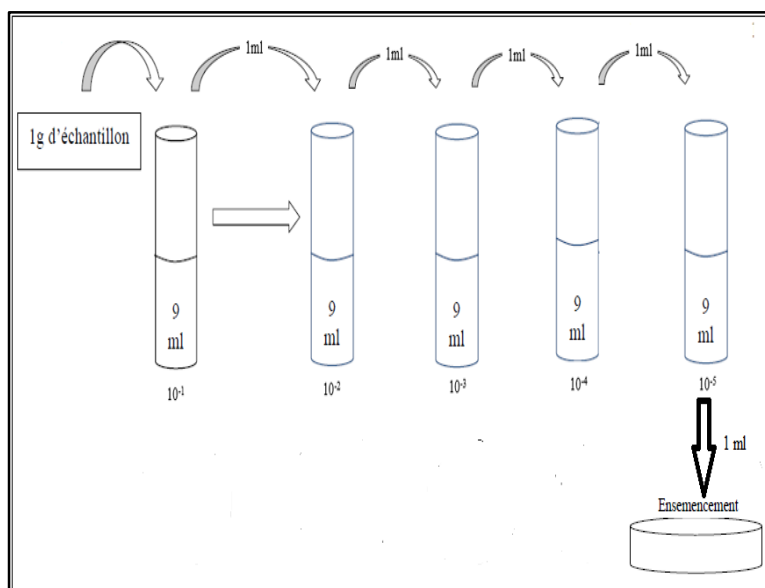


Figure 20 : Préparation des dilutions de sol (Saravana *et al.*, 2012).

À l'aide d'une pipette pasteur stérile sous forme de râteau 0,1 ml de chaque dilution (10^{-5}) a été étalée à la surface d'un milieu gélosé (agar d'amidon Caséine). Trois répétitions ont été réalisées pour chaque échantillon, les boîtes de Pétrie ont été incubées à 30 ° C pendant 7 à 14 jours (Collins *et al.*, 1995 ;Sudha et Hemalatha, 2015).

5. Purification et conservation des isolats

Les colonies d'actinobactéries sélectionnées sont prélevées délicatement à l'aide d'une anse de platine stérile puis purifiées par stries sur gélose nutritif (Annexe) et incubés pendant une semaine à 30°C. Cette opération est répétée jusqu'à obtention des souches pures. La souche pure doit être conservée à 4°C pour une réalisation ultérieure des tests biochimiques, physiologiques et de la technique fermentation (Shirling et Gottlieb, 1966).

6. Caractérisation et identification des Actinobactérie

6.1. Caractérisation macroscopique

Après incubation, les colonies d'actinobactéries qui apparaissent à la surface du milieu d'isolement ont été examinées à l'œil nu et à l'aide d'une loupe optique binoculaire (ZEISS 475022 G x10). 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 Saravana *et al.* (2012).

6.2. Caractérisation microscopique

Les caractéristiques microscopiques ont été réalisées par la méthode de coloration de Gram.

Les principales étapes de cette coloration sont les suivantes :

- Des frottis sont réalisés à partir des colonies des actinobactéries bien isolés à l'aide d'une anse de platine dans des conditions aseptiques.
- Les bactéries sont émulsionnées dans une gouttelette d'eau distillée stérile ;
- Les frottis sont fixés par une flamme à l'aide d'un bec bunzen ;
- Quelques gouttes de violet de gentiane sont déposées sur la lame pendant 1min, puis rinçage par eau distillé.
- Couvrir la lame avec la solution de Lugol pendant 1 minute ;
- Le frottis est décoloré avec de l'alcool pendant 10 secondes, puis rincer à l'eau stérile ;
- Quelques gouttes de la safranine sont déposées sur lame pendant 45 secondes ;
- Après lavage à l'eau, le frottis a été séché avec du papier absorbant
- Observation au microscope optique du faible grossissement 10 jusqu'au fort (G100 x).

6.3. Caractérisation physiologique

Les isolats d'actinobactérie sont caractérisés en utilisant quelques tests comme : test de l'hydrolyse de l'amidon, l'hydrolyse de la caséine, la dégradation de l'urée (**Kalyaniet al., 2012**).

6.3.1. L'hydrolyse de l'amidon

Les tests consistent à observer l'hydrolyse ou non de l'amidon (0,1%) sur la gélose nutritif. Après l'incubation à 30°C, on recouvre la gélose par la solution de Lugol. Si l'amidon est hydrolysé cela se traduit par l'absence de coloration autour des colonies bactériennes. A l'inverse, les zones contenant de l'amidon se colorent en bleue.

6.3.2. L'hydrolyse de la caséine

Le milieu gélosé a été additionné à 5% de lait écrémé. Les boîtesensemencées par les actinobactéries sont observées après quelques jours d'incubation à 30°C. La clarification de la gélose autour des colonies confirme l'hydrolyse de la caséine (**Geraldineet al., 1981 ; Chaphalkar et Dey, 1996**).

6.3.3. La dégradation de l'urée

Ce test est basé sur l'ensemencement de 0,05 ml de l'inoculum d'actinobactérie dans le milieu contenant le rouge de phénol et l'incubation pendant 7 jours à 30°C. ces milieux prennent une teinte rouge si l'urée est dégradée signifié la souche de *Streptomyce* possède des enzymes uréases (**Guiraud, 1998**).

6.4. Caractérisation biochimique

Il existe plusieurs tests biochimiques tels que l'utilisation de citrate, la production d'H₂S, la catalase, l'hydrolyse de la gélatine, les tests des réactions VP et RM (les acides mixtes par la réaction de rouge méthyle ; fermentation de butylène glycolique par la réaction de Voges-Prauskaouer) et la réduction de nitrate (**Kalyaniet al., 2012**).

6.4.1. L'utilisation de citrate

Le milieu utilisé est le citrate pour déterminer la capacité de la souche à utiliser le citrate comme seule source de carbone. L'ensemencement d'actinobactérie sur un milieu incliné par des stries longitudinales au moyen d'une anse et suivi d'une incubation à 30°C pendant 7jours. Le virage de la couleur du vert en en bleu du milieu traduit l'utilisation du citrate par les souches.

6.4.2. Les réactions VP et RM

Sur un milieu liquide Clark et Lubs, une colonie de la souche à étudier estensemencée puis incubé à 30°C pendant 7jours. Après l'incubation, en diviser le milieu dans deux tubes stériles et on ajoute quelques gouttes de VP I dans l'un des deux tubes et quelques gouttes de

VP II dans l'autre tube. Quelques gouttes de réactif rouge de méthyle sont additionnées dans un seul tube, s'il y a le virage en rouge, le test est positif.

6.4.3. La réduction de nitrate réductase

La production de nitrate réductase est réalisée sur un milieu liquide nitraté ensemencé par des actinobactéries, puis incubée à 30°C durant 5 à 7 jours. La lecture se fait en ajoutant trois gouttes des réactifs de Griess I et II. La réduction de nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En absence de cette coloration on ajoute la poudre de zinc :

- La présence de la coloration rouge indique présence de nitrate dans le milieu donc le test est négatif (la souche n'a pas produit l'enzyme réductase nitrite).
- En absence de la coloration, le test est positif (le stade nitrite a été dépassé donc les bactéries possédant une nitrate réductase très active).

6.4.4. La production d'H₂S

Des tubes contenant du milieu TSI sont ensemencés par les bactéries actinomycètes, puis incubés pendant 14 jours à 30°C. La production de l'H₂S se manifeste par un noircissement du culot.

6.4.5. La catalase

Sur une lame et à l'aide d'une pipette Pasteur, on dépose une colonie d'actinobactérie et on ajoute de l'eau oxygénée, le résultat positif représente dégagement d'oxygène donc la souche contient une enzyme ayant la propriété de décomposer le peroxyde d'hydrogène (H₂O₂).

6.4.6. Hydrolyse de la gélatine

Les bactéries d'actinobactérie 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 correspond à l'hydrolyse de la gélatine.

7. Test antimicrobien de la souche d'actinomycète

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactérie est mise en évidence par criblages. Le premier criblage est réalisé sur un milieu solide, consiste à sélectionner le meilleur isolat par l'inhibition des souches pathogènes (*E. coli* ATCC 25922 et *S. aureus* ATCC25923), qui sera ensuite utilisé dans le deuxième criblage pour la réalisation de la fermentation. Vu que l'actinomycète est impliquée dans la synthèse des substances antibiotiques comme la streptomycine, le choix de ces souches pathogènes (*E. Coli* et *S. aureus*) a été basé sur leurs sensibilités vis-à-vis cet antibiotique.

7.1. Criblages primaire

La sensibilité microbienne a été analysée par méthode de stries. Chacun des isolats a été ensemencé de deux manières : rayé comme une ligne droite sur la gélose nutritive et déposé au centre de la boîte, puis incubés à 30 ° C pendant 6 jours. Après le 6^{ème} jour, les souches pathogènes *E. coli* et *S. aureus* sont striées à angle droit sans toucher la souche d'actinobactérie, puis incubées à 37 ° C pendant 24 à 48 heures. Si les souches sont sensibles à l'antibiotique produit par les actinobactérie, on note absence de leurs croissances. La zone d'inhibition doit être notée vis-à-vis de chaque souche d'essai (**Kalyani et al., 2012**).

8. La fermentation submergée

Sur la base de la zone d'inhibition du criblage primaire, les isolats qui ont un potentiel antimicrobiens important ont été sélectionnés pour la fermentation. Le composé bioactif brut produit par la fermentation submergée va être suivi d'une extraction par un solvant. L'antibiotique doit être conservé pour des tests ultérieurs tels que l'analyse l'antibiogramme.

8.1. Préparation d'inoculum et fermentation

La souche d'actinobactérie déjà identifiée est ensemencée en surface sur un milieu Bennett gélosé dans un Erlenmeyer. Après 7 à 10 jours d'incubation à 30°C, les spores sont raclées par ajout de 10 ml bouillon Bennett stérile suivie d'une agitation vigoureuse. Le comptage des spores a été estimé par mesure de l'absorbance à 620 nm à l'aide d'un spectrophotomètre. Les lectures photométriques peuvent être aussi traduites par dénombrement au microscope à l'aide d'une cellule de Thomas (Objectif X40). Des dilutions décimales sont effectuées en cas où l'inoculum est concentré, pour obtenir une suspension sporale de 10⁶ spore/ml. La pré-culture des spores d'actinobactérie est utilisée pour inoculer les milieux de fermentation. Un volume 3 ml de l'inoculum (3% du volume utile) est transvasé dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 150 ml du milieu bouillon Bennett, incubés à 30 ° C pendant 7 jours sous agitation continue à une vitesse de 240 rpm et chaque jours on a mesuré le poids des isolats.

Cependant, le comptage des spores n'a pas été estimé par l'absorbance (technique de spectrophotomètre) vu l'indisponibilité des moyens, par contre la deuxième technique de dénombrement des spores par la cellule de Thomas a été effectuée.

8.2. Extraction des ATB

Après la fermentation, une filtration sous vide sur le charbon actif a été effectuée pour séparer le mycélium et récupérer le filtrat. Le filtrat a été acidifié par l'acide H₂SO₄ (pH = 2) (fig. 22). Selon le protocole de **Larpent et al. (1998)**, l'acétate de butyle a été remplacé avec le solvant acétate d'éthyle (V/V). Le mycélium est recueilli après filtration et lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation (3000 g) pendant 10 min. 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 (Mechlinski, 1978). 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. 21).

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.22). Le composé obtenu va être ainsi utilisé pour les prochaines manipulations de test antibiogramme.

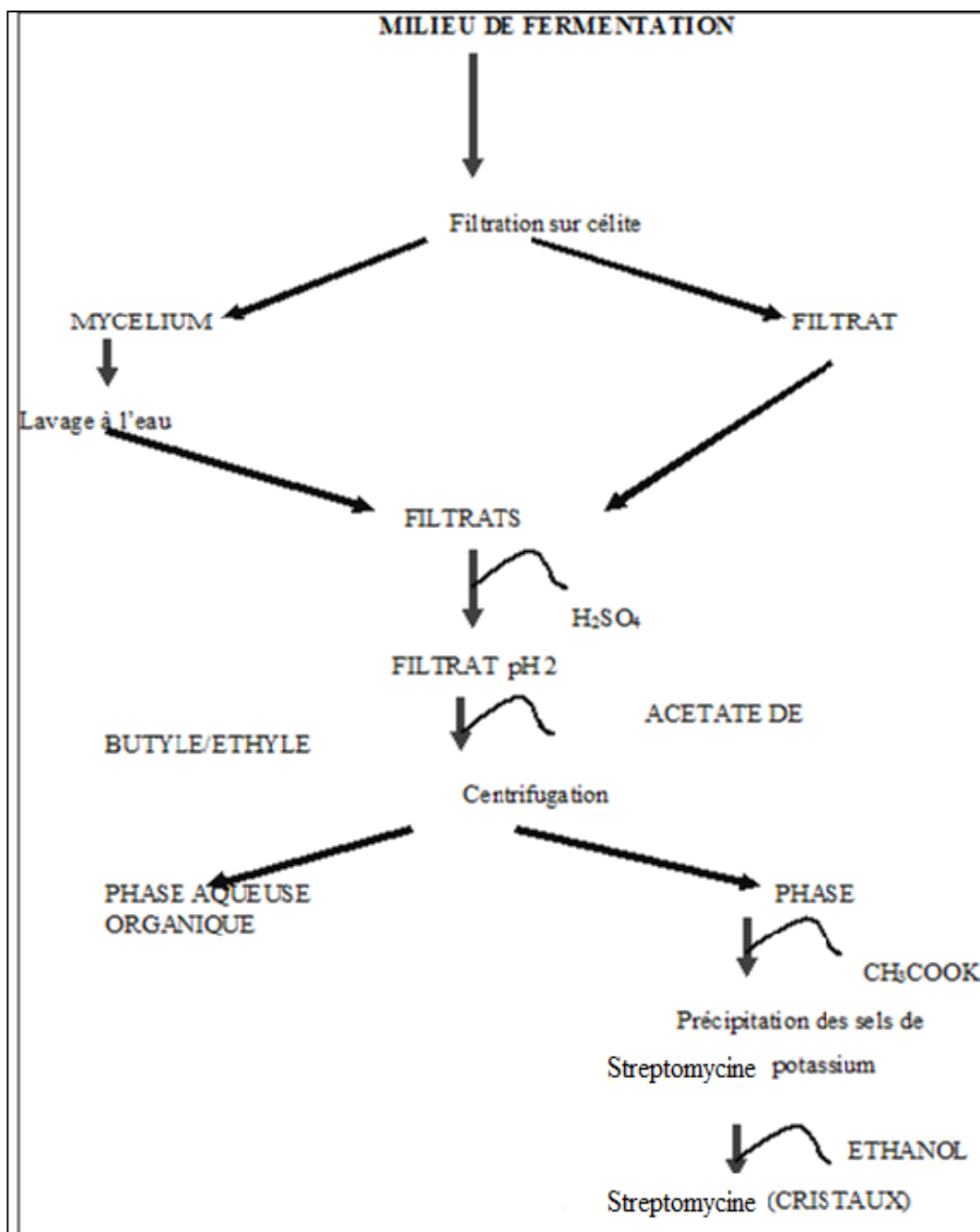


Figure 21 : Protocole d'extraction des antibiotiques (Larpent et al., 1998).

9. Extraction des huiles brutes

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. Le nombre de répétition effectué est de deux pour chaque échantillon de souche afin de déterminer le rendement moyen en l'huile. Le rendement moyen pondéral de l'huile 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 ;

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

- P_E : Poids de la prise d'essai (masse microbienne) en gramme.

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

La technique de diffusion en disque a été employée pour déterminer l'activité antibactérienne de l'antibiotique ATB et de l'huile brute de l'actinobactérie (fig. 22).

Des boîtes de Pétri ont été préparées avec 20 ml d'agar Muller Hinton stérile. Après réactivation des souches d'essai *E. coli* et *S.aureus* sur l'eau physiologie stérile ont été ensemencées à la surface à l'aide d'un écouvillon stérile. Des disques de papier de 6 mm de diamètre stériles ont été imbibés à différentes concentrations d'antibiotique et d'huile ($C_1 = 0,0625$ mg/ml ; $C_2 = 0,125$ mg/ml ; $C_3 = 0,25$ mg/ml ; $C_4 = 0,5$ mg/ml ; $C_5 = 1$ mg/ml). Ils ont été déposés sur le milieu en distance. Ensuite, les boîtes des différentes cultures ont été incubées à 37 ° C, après 24 h les zones d'inhibition des deux extraits ont été mesurées en mm et détermination la CMI et la CMB.

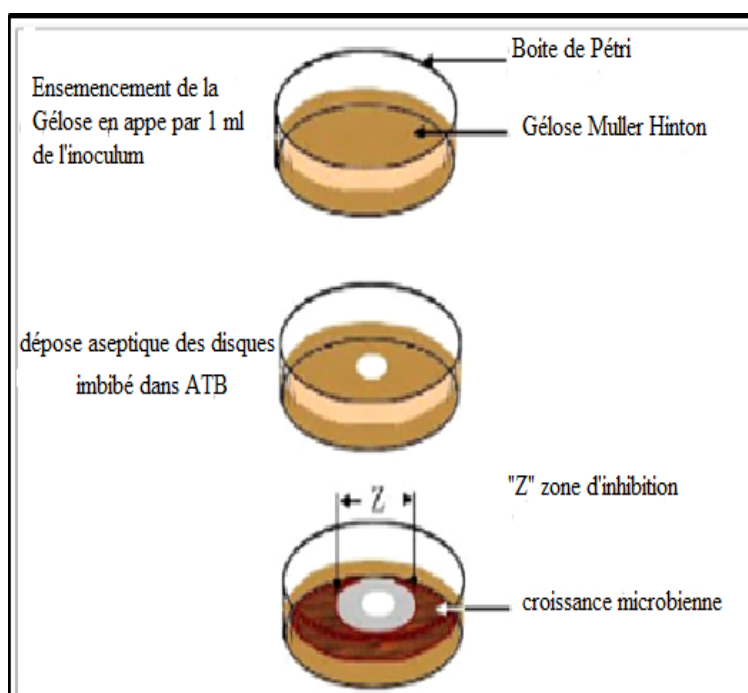


Figure 22 : Technique du test antibiogramme des extraits ATB et l'huile des 'isolat d'actinomycète (diffusion de disque) (Anonyme).

Résultats
et
Discussion

IV. Résultats et discussion

1. Étude morphologique des actinomycètes

L'étude morphologique des actinomycètes est basée sur l'identification des aspects macroscopique observé à l'œil nu et à la loupe binoculaire, ainsi qu'aux différentes observations microscopique des différents isolats obtenus.

Le traitement des sols avec le CaCO_3 qui a été utilisé pour avoir un bon isolement des actinobactéries représente un nombre important de colonie $1,1 \times 10^6$ UFC/ml. Toutefois, ce prétraitement a réduit les différentes contaminations par rapport aux sols non traités avec le CaCO_3 .

Les travaux de **Kitouni (2007)** sur les écosystèmes extrêmes et **Boudemagh (2007)** sur les sols sahariens et **Belabed (2014)**, sur les sols forestières de la région de Mostaganem, démontrent que les sols présentent au moyenne $1,5 \times 10^5$ UFC/ml d'actinomycètes et confirment que le meilleur traitement des sols pour l'isolement des actinobactéries est le traitement avec le CaCO_3 . Cependant, **Jeffrey (2008)**, a démontré que le traitement avec le CaCO_3 réduit le nombre des bactéries à Gram négatif dans les échantillons des sols.

1.1. Aspects macroscopiques

Le tableau 4 regroupe les résultats des observations morphologiques obtenus.

Tableau 4 : Caractérisations macroscopiques et microscopiques des isolats des *Streptomyces* sp.

	Taille			Forme	Mycélium Végétatif	Mycélium Aérien	
	Pet	Moy	Gr		Hyphes	Hyphes	Spore
SA	+			Bombé, velouté	beige	Beige, Droit	exogène
SB		+		Bombé	Blanc	Verdâtre, Droit	exogène
SC	+			Bombé	beige	Blanc, Droit	exogène
SD			+	Bombé	blanc	Beige, Droit	exogène
SE	+			Verticillé	blanc	Brun, Droit	exogène
SF			+	Verticillé	blanc	Blanc, Droit	exogène
SG	+			Bombé	Blanc	Marron, Droit	exogène
SH		+		Aplatie	Blanchâtre	Blanchâtre, Droit	exogène
SI			+	Lisse crémeuse	Beige	Marron, Droit	exogène
SJ			+	Lisse crémeuse	Beige	Marron, Droit	exogène
SK			+	Bombé	Blanchâtre	Blanchâtre, Droit	exogène

S : souche ; Pet : Petite ; Moy : Moyenne ; Gr : Grande ;

Après 8 jours d'incubation sur milieu l'amidon caséine agar, les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leurs aspects morphologiques macroscopiques caractéristiques (tab. 4).

On a noté que les échantillons de sols sont riches et diversifiés en actinobactéries, cela a permis de sélectionner plusieurs isolats susceptibles d'être ultérieurement sélectionnés pour leurs aptitudes antagonistes. Les résultats montrent après l'isolement qu'il existe onze souches des actinomycètes isolé du sol de la région d'Ouillis (Mostaganem) (fig. 23).

Les colonies obtenues ont des tailles différentes petite, moyenne et grande dont 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. (tab. 4 et fig. 23). D'après, **Balasubramaniam et al. (2011)**, les couleurs du mycélium aérien ne sont pas les même que le mycélium du substrat et la plupart ont une couleur blanchâtre et des autres couleurs comme le : Gris, beige, noir, marron, vert, jaune, ce qui confirme les résultats constatés (fig. 23).

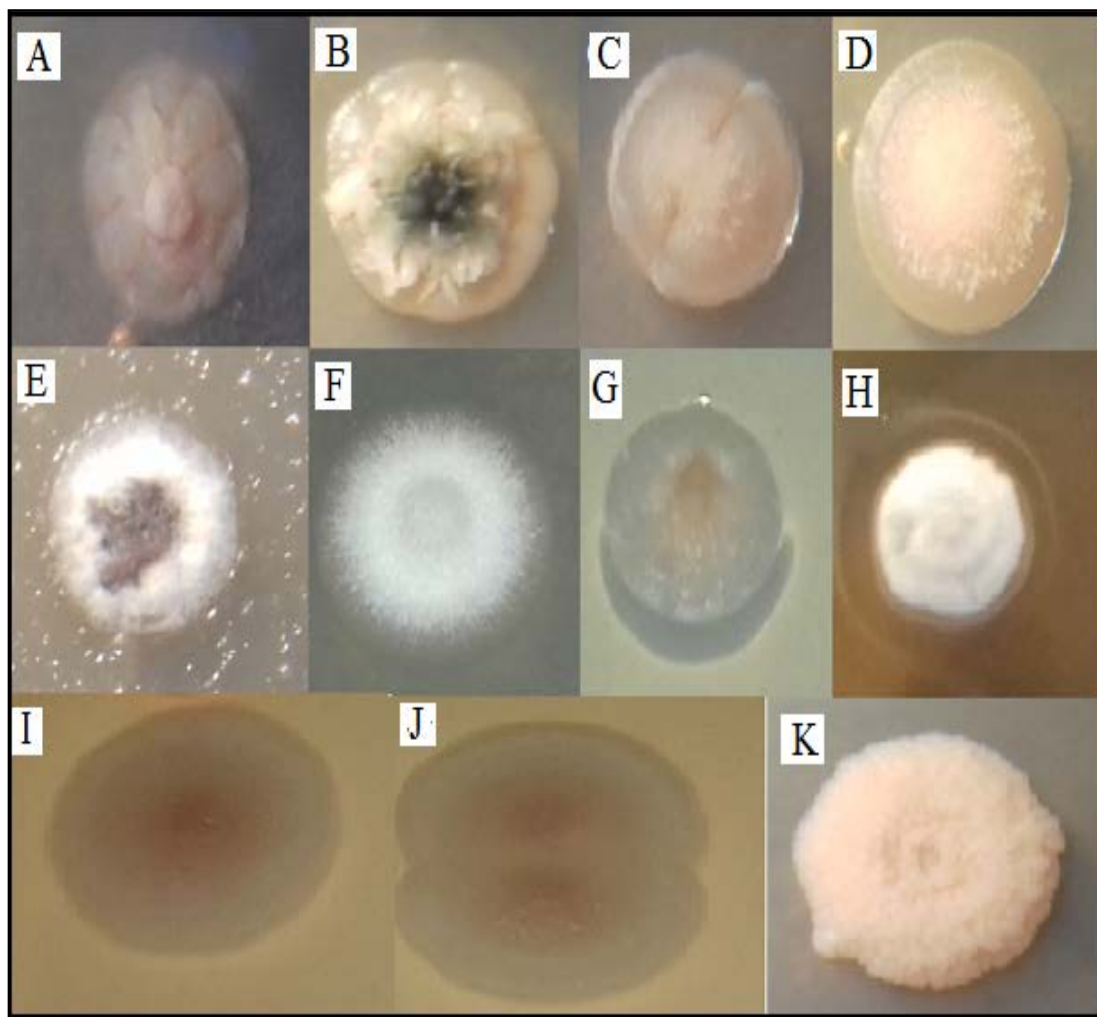


Planche. 23 : Observations macroscopiques des colonies des *streptomycetes sp.* à l'aide d'une loupe binoculaire 4x10.

La seconde étape était la purification des onze isolats sur le milieu nutritif gélosé pour vérifier leurs puretés. Les souches pures d'actinomycètes présélectionnés pour le test antagonisme sont présentées dans les figures de la planche 1 où les mêmes résultats et remarques sont observés pour les colonies des différentes souches concernant la taille, la forme et la couleur etc. (fig.24).

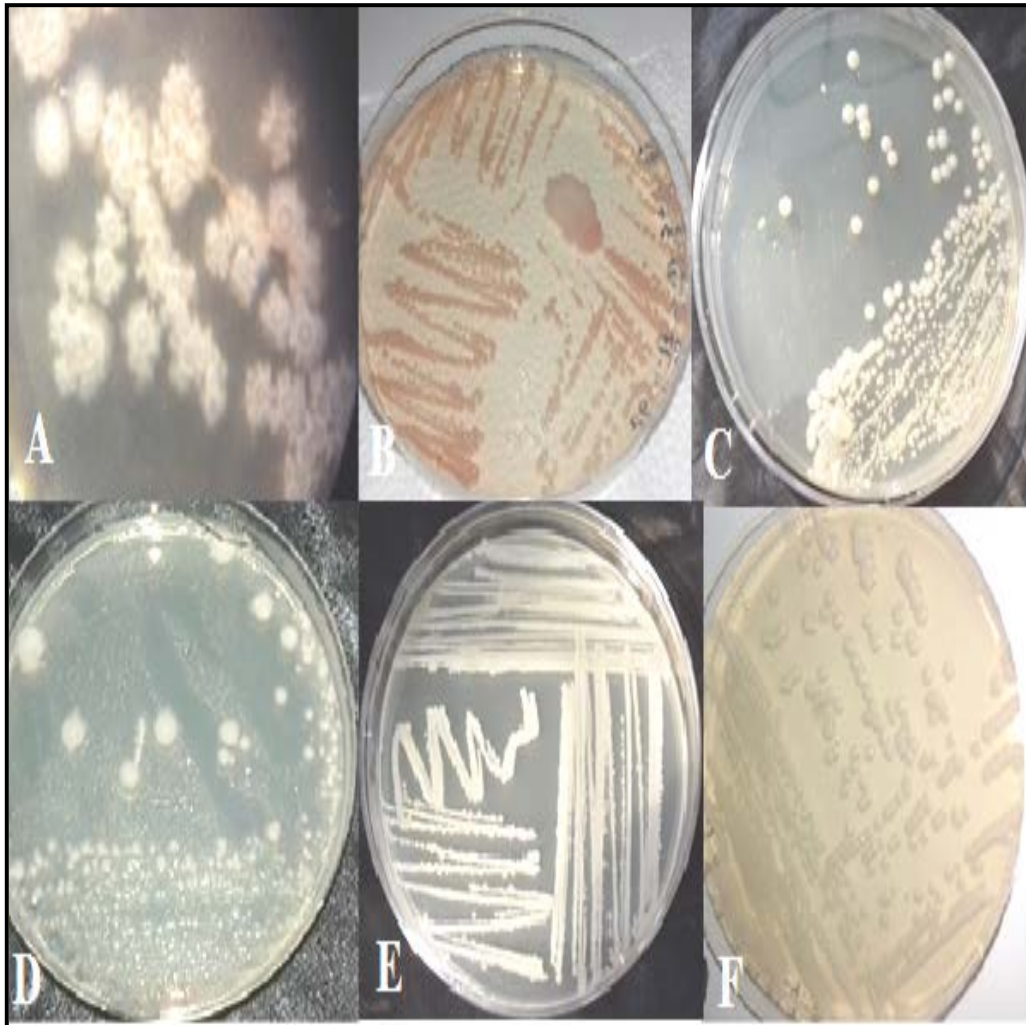


Figure 24 : Purification des isolats *Streptomyces* sp. sur gélose nutritif.

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, elles constituent le groupe bactérien le plus variable et le plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. Lorsqu'ils évoluent sur un substrat solide, comme la gélose, ils se développent sur la surface et à l'intérieur du milieu de culture (**Prescott, 2010**). Ce qui explique leurs dénominations en grec « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants) (**Gottlieb, 1973**)

1.2. Aspects microscopiques

Comme tous les *Streptomyces*, les observations microscopiques de coloration de Gram des souches isolées a montré qu'elles sont toutes des bactéries à Gram positif. Le mycélium végétatif des souches présentent une structure cloisonnée avec un nombre limités de sporanges, qui sont des sacs contenant des endospores rencontrés à l'intérieur du milieu solide (fig. 25).

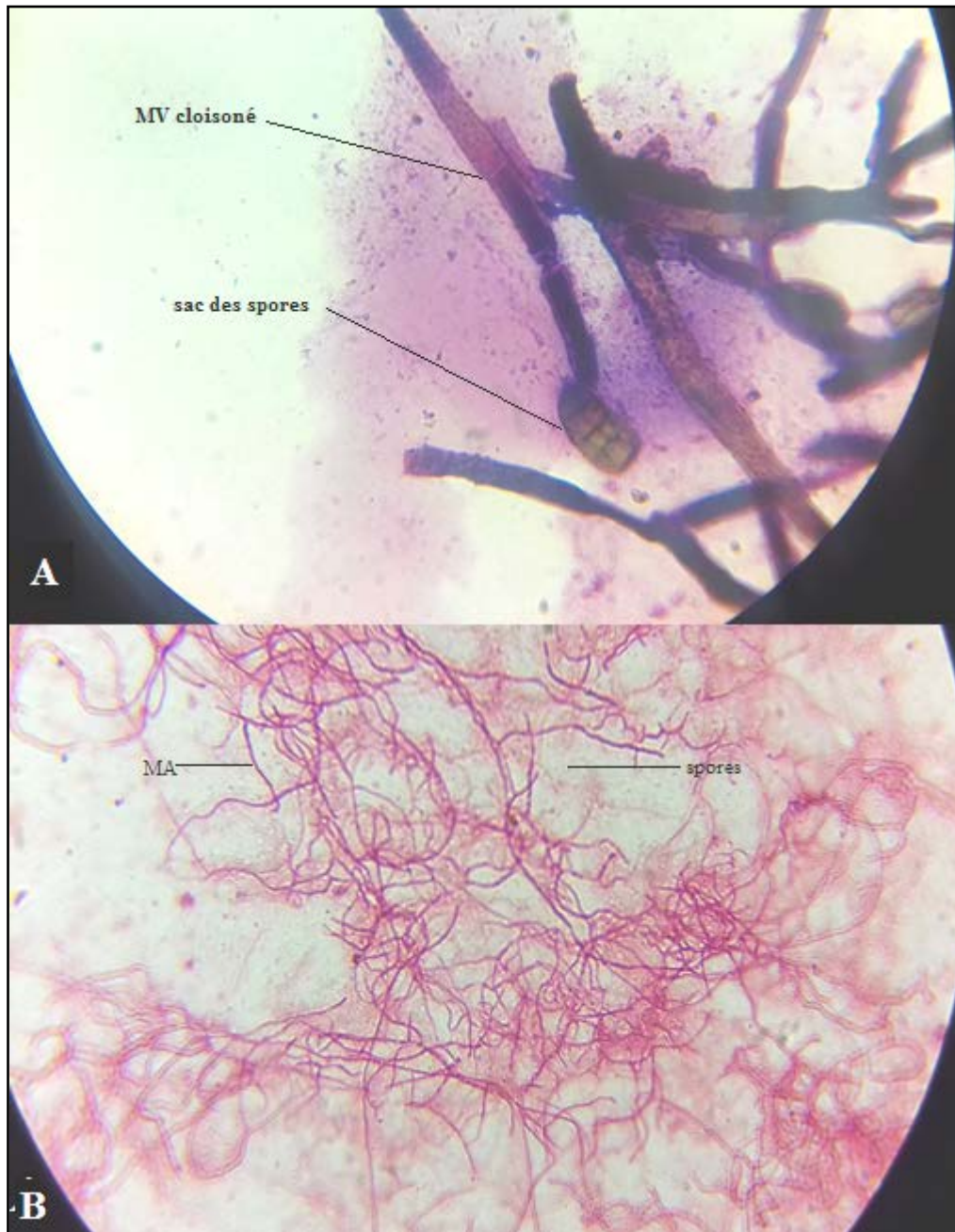


Figure 25 : Observation microscopique de mycélium

A : Mycélium végétatif (Gr x40) ; **B** : Mycélium aérien (Gr X100)

Le mycélium aérien est constitué des hyphes fins, ramifiés, non septés qui se terminent par des chaînes droites des spores en forme cylindrique (fig.25). Les spores des actinobactéries résultent d'une série de changements et de développement des hyphes aériens, elles sont organisées en structures conidies, qui sont des spores exogènes asexuées à une organisation polysporés. Ces résultats obtenus se concordent avec la description de **Holt *et al* (1994)** et **Nanjwadet *al* (2010)**, les actinobactéries sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positive.

2. Test antagonisme des souches *Streptomyces sp*

Grâce aux différents tests d'antagonisme, six souches d'actinobactéries productrices des substances bioactives sont sélectionnées parmi les onze souches qui ont été isolés et testés. Ces souches actives contre la souche pathogène *S. aureus* présentent un pourcentage de 54,54% des isolats d'actinobactéries. Les six souches *Streptomyces sp* étudiées possèdent de fortes potentialités inhibitrices contre les bactéries Gram positif *S. aureus*, alors qu'aucune zone d'inhibition n'a été enregistrée contre les bactéries Gram négatif *E. Coli* (fig.26 A et B).

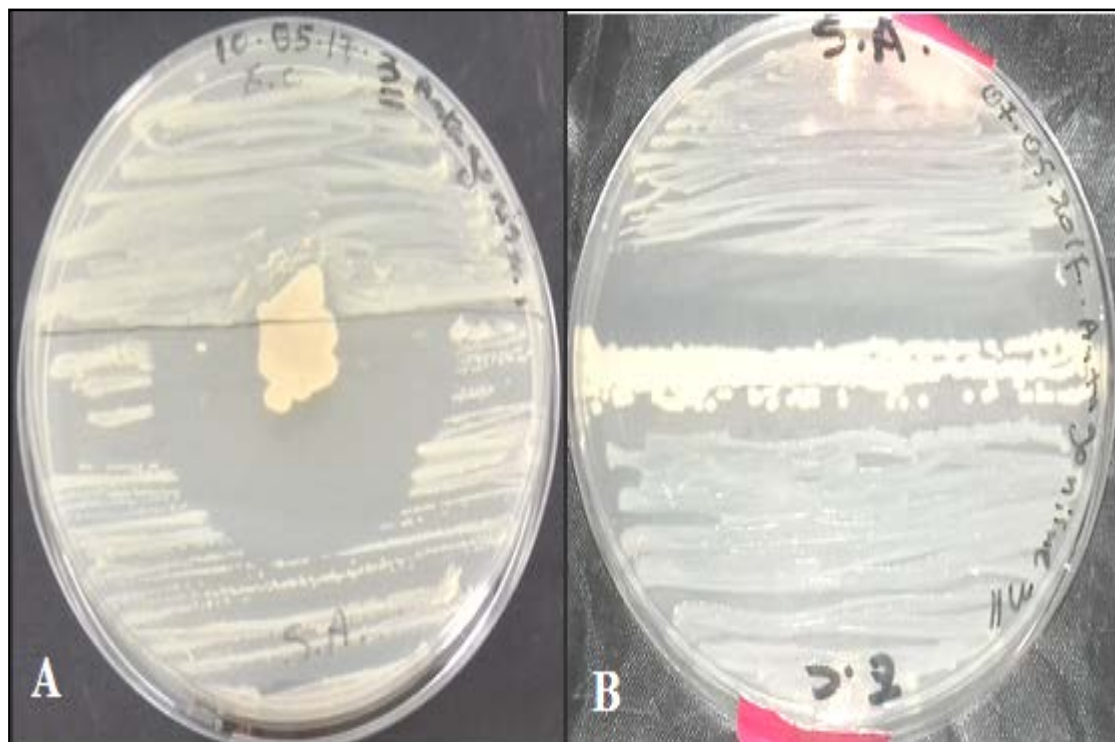


Figure 26 : Résultats du test d'antagonisme par deux méthodes.

A : Explant de *Streptomyces sp.* déposé au centre.

B : Ensemencement *Streptomyces sp.* par strie.

Cette activité antimicrobienne notée reste remarquable en fonction des zones d'inhibition. Lors du test d'antagonisme des souches de *Streptomyces sp.* vis-à-vis la souche pathogène *Staphylococcus aureus* des diamètres des zones d'inhibition enregistrés sont élevés et varient de 2 à 5 cm. En ce qui concerne les deux souches testées, les bactéries à Gram positif (*S. aureus*) apparaissent plus sensibles en comparant avec les bactéries à Gram négatif (*E. coli*) aux molécules bioactives sécrétées par les isolats des actinomycètes, ceci a été également constaté par **Hasavada et al. (2006) ; Atta et al. (2009) et Belabed (2014)**.

3. Tests physiologiques et biochimiques

Les résultats des différents tests physiologiques et biochimiques des 6 souches d'actinomycètes sélectionnées sont présentés dans le tableau ci-dessous.

Tableau 5 : Les Tests physiologiques et biochimiques des isolats d'actinomycètes.

Caractéristiques	Les Souches	TM	S1	S2	S3	S4	S5	S6
Hydrolyse de la caséine		-	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon		-	+	+	+	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine		-	+	+	+	+	+	+
Réduction des nitrates		-	-	-	-	+	-	-
Production d'H ₂ S		-	+	+	+	+	+	+
Recherche de Catalase		-	+	+	+	+	+	-
Dégradation de l'urée		-	+	+	+	+	+	+
L'utilisation de citrate		-	-	-	-	-	-	-
Les fermentations intermédiaires	VP	-	+	+	+	+	+	+
	RM	-	+	+	+	+	+	+
TM : Témoin ; S : Souche ; (+) : Test positif ; (-) : Test négatif ; VP : Vogues Prauskouer ; RM : Rouge méthyle								

➤ **Hydrolyse de la caséine :**

Autour des six souches bactériennes isolées on voit clairement la présence des zones claires comparant avec le milieu de la boîte témoin et les zones des mêmes milieux de cultures hormis les souches actinomycètes. Le test d'hydrolyse de la caséine est positif pour les six isolats d'actinomycètes (tab. 5 et fig. 27).

La présence de ces zones claires signifie que la caséine présente dans le milieu de culture a été hydrolysée par les souches, ce qui explique que ces bactéries ont la capacité de synthétiser l'enzyme chimosine et trypsine.

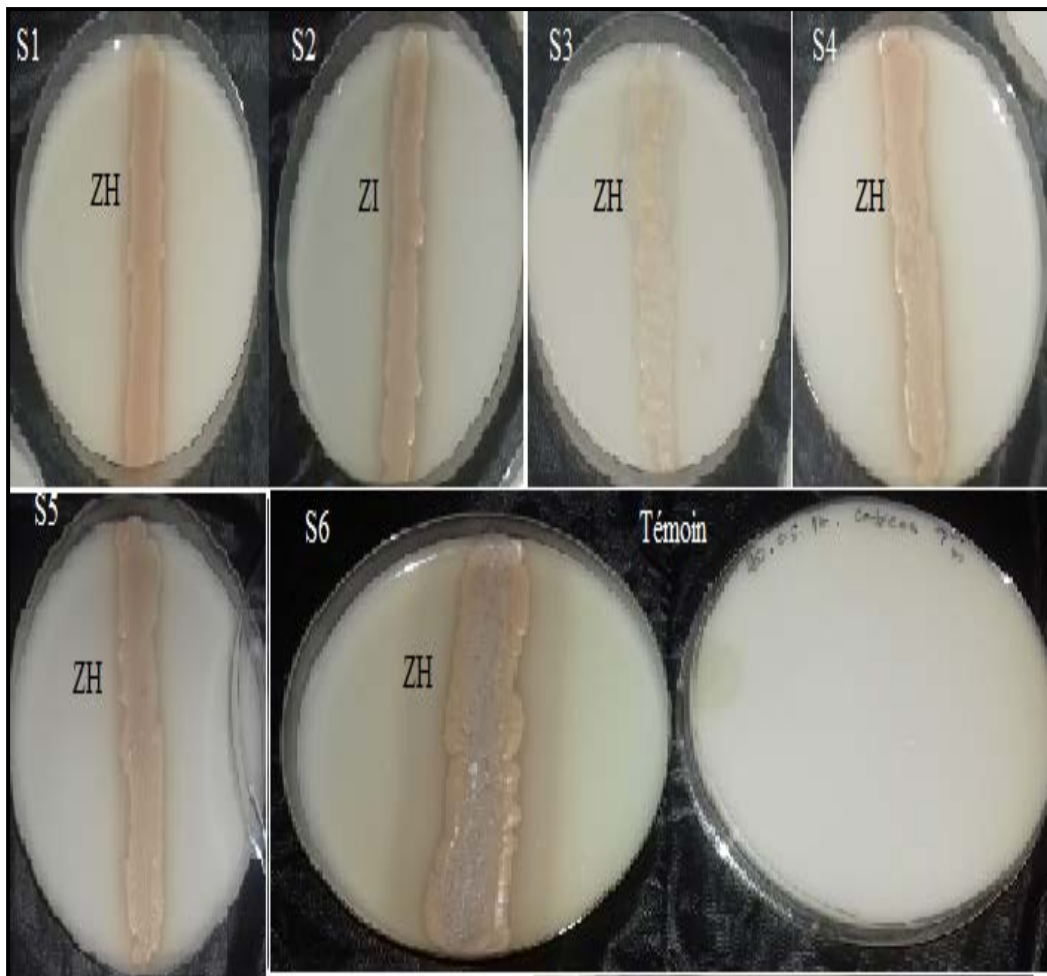


Figure 27 : Hydrolyse de la caséine.

Dans certains travaux réalisés sur les tests physiologiques d'actinobactéries isolés des sols confirment que la plupart des souches *Streptomyces sp* peuvent hydrolyser les caséines du lait (Dhananjeyan *et al.*, 2010; Kalyani *et al.*, 2012 et Belabed, 2014).

➤ **Hydrolyse de l'amidon :**

L'absence de coloration autour des bactéries, signifie l'hydrolyse de l'amidon dans cette zone par l'enzyme amylase des bactéries. Par contre la couleur marron du réactif Lugol dans le reste du milieu a virée vers la couleur bleue (tab. 5 et fig. 28) ce qui explique la présence de l'amidon dans milieu. Le test d'hydrolyse de l'amidon est positif pour les six isolats d'actinomycètes.

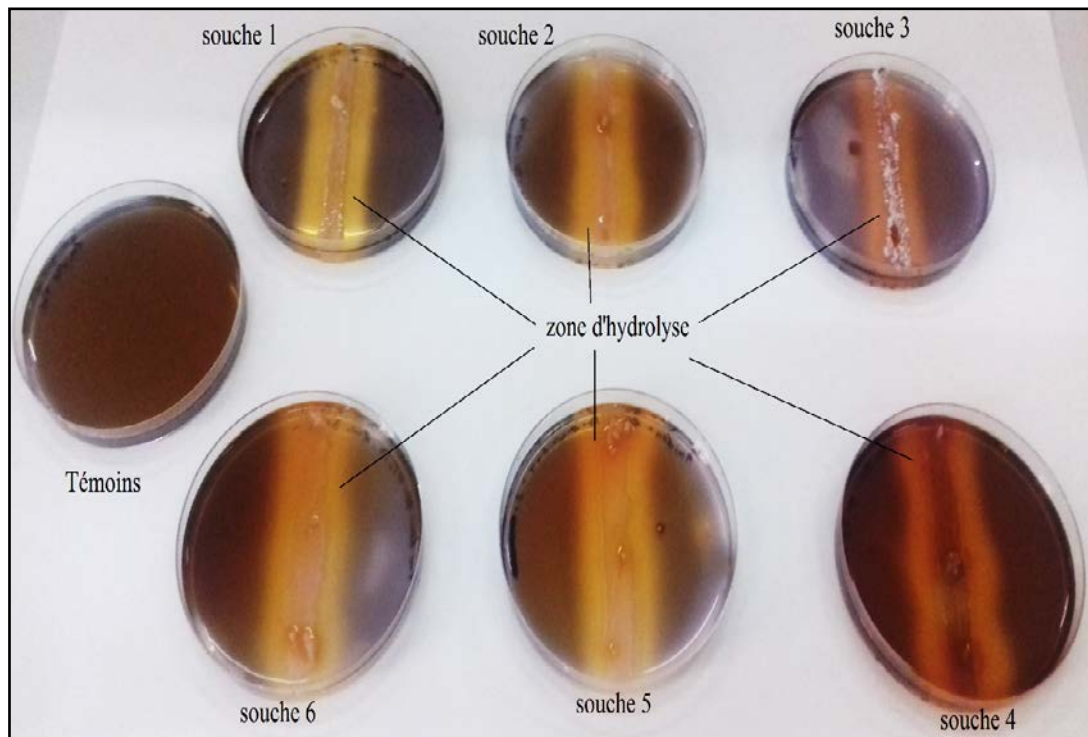


Figure 28 : Test positif d'hydrolyse de l'amidon en présence des six isolats des *Streptomyces sp.*

Plusieurs travaux entrepris sur l'hydrolyse de l'amidon par les *Streptomyces sp* confirment les résultats obtenus (Dhananjeyan *et al.*, 2010; Kalyani *et al.*, 2012 et Belabed, 2014).

➤ **Hydrolyse de la gélatine :**

La gélatine est un polymère protéique thermoréversible, leur incorporation dans le milieu de culture a permis de tester la capacité des isolats de *Streptomyces sp* à hydrolyser cette protéine. Les résultats obtenus de ce test sont positifs, ils montrent que la gélatine du milieu a été hydrolysée par la gélatinase sécrétée par les six souches (tab. 5 et fig. 29).



Figure 29 : Test positif d'hydrolyse de la gélatine en présence des *Streptomyces sp.*

Les mêmes résultats sont obtenus par plusieurs chercheurs qui ont travaillé sur les actinomycètes des sols tels que les travaux de **Kalyani et al. (2012)** sur les sols marins, **Boughachiche (2012)** sur le sol de Sebkhha et **Belabed (2014)** sur le sol foresterie de Mostaganem.

➤ **Réduction des nitrates :**

La figure 30 ci-dessous montre que le test des nitrates est positif en présence de la souche quatre (S4) de *Stréptomyces sp.* La couleur du milieu n'a pas changée en présence des réactifs NR1 et NR2 et même lorsque on ajouté la poudre de Zn. Cela permet de dire que les nitrate du milieu sont transformés en nitrites ce qui explique que les bactéries de cette souche possède l'enzyme nitrate réductase très active.



Figure 30 : Tests réduction des nitrites positif en présence S4 et négatif avec les autres souches.

Les autres isolats (S1, S2, S3, S5 et S6) de *Stréptomyces* sp présentent un changement de couleur (rouge) indiquant que le test est négatif. Ce résultat négatif obtenu a été déjà indiqué par **Kannabira et Deepika (2009)** dans leur article sur l'activité anti-dermique des actinomycètes. Par contre, le résultat positif enregistré avec la souche (S4) est identique aux résultats mentionnés dans les travaux de **Kalyani et al. (2012)** sur les sols marins, **Boughachiche (2012)** sur le sol de Sebkhah et **Belabed (2014)** sur le sol foresterie de Mostaganem.

➤ **Production d'H₂S :**

Les isolats (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) de *Stréptomyces* sp présentent un test positif d'où on a noté un noircissement du culot au fond des tubes de TSI. Cela explique que les souches bactériennes sont productrices de H₂S (Fig. 31).

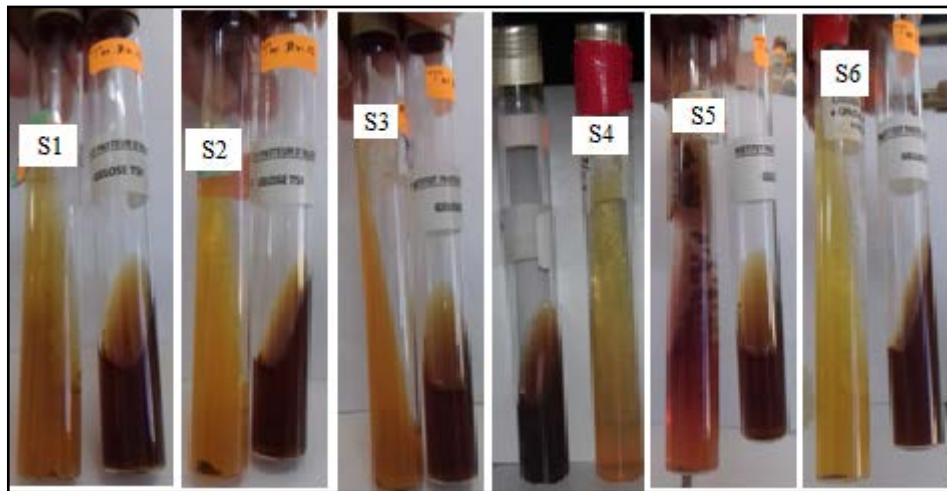


Figure 31 : Test positif de production d'H₂S avec les six souches *Stréptomyces* sp.

Ces résultats sont similaires à ceux qui ont été obtenus par **Kannabira et Deepika (2009)** et **Vengadesh et al. (2011)**.

➤ **Recherche de Catalase :**

Le test de la recherche de catalase est positif pour l'ensemble des isolats de *Stréptomyces* sp (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) à l'exception de l'isolat S6 (fg. 32). Les mêmes résultats sont obtenus par les chercheurs **Kannabira et Deepika (2009)**, **Vengadesh et al. (2011)**, **Kalyani et al. (2012)**, **Boughachiche (2012)** et **Belabed (2014)**.

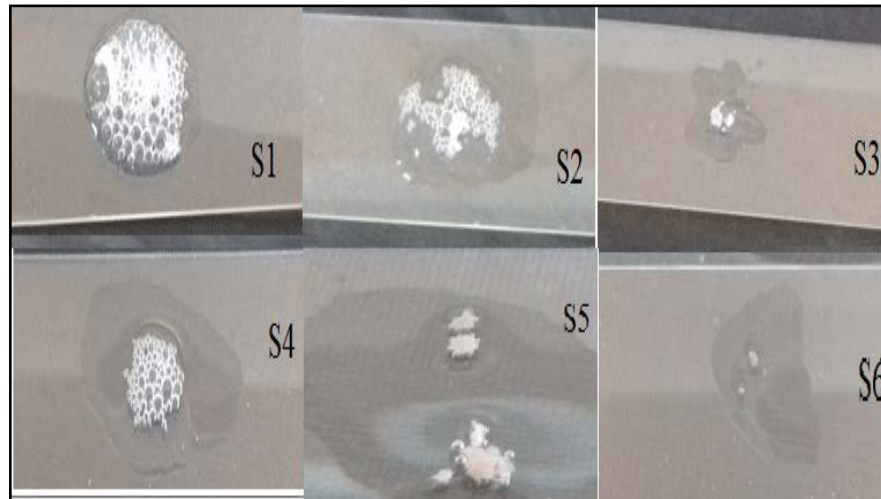


Figure 32 : Test négatif avec S5 et S6 de la catalase et positif avec les autres isolats.

➤ **Dégradation de l'urée :**

La couleur du milieu teinte rouge qui indique la dégradation de l'urée. Cela signifie que les six isolats de présentent un test positif, ce qui veut dire que les souches bactérienne possèdent l'enzyme uréase responsable (fig. 33).

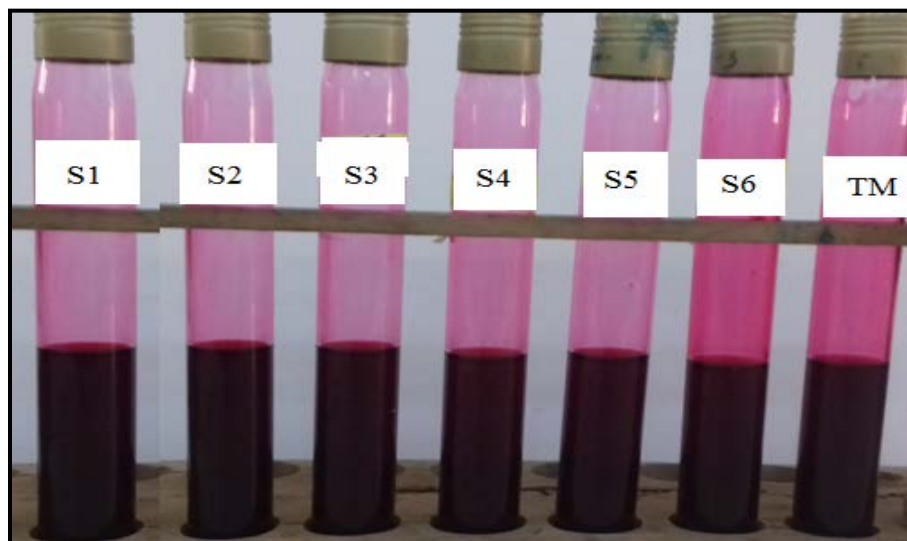


Figure 33 : Test positif de dégradation de l'urée en présence des six isolats de *Streptomyces* sp. Les mêmes résultats sont obtenus par les chercheurs montre que les souches de *Streptomyces* sp peuvent dégradés l'urée (Kannabira et Deepika, 2009, Vengadesh *et al.*, 2011 ; Kalyani *et al.*, 2012 ; Boughachiche, 2012).

➤ **L'utilisation de citrate :**

Les résultats obtenus avec les différents isolats de *Streptomyces* sp sont négatifs, les souches n'ont pas utilisés le citrate du milieu comme source de carbone (fig. 34). La couleur du milieu est

restée vert et elle n'a pas virée vers le bleu. Les mêmes résultats sont publiés par **Kannabira et Deepika, (2009)**, **Dhananjeyan et al. (2010)** ; **Vengadesh et al., (2011)** et **Kalyani et al. (2012)**.

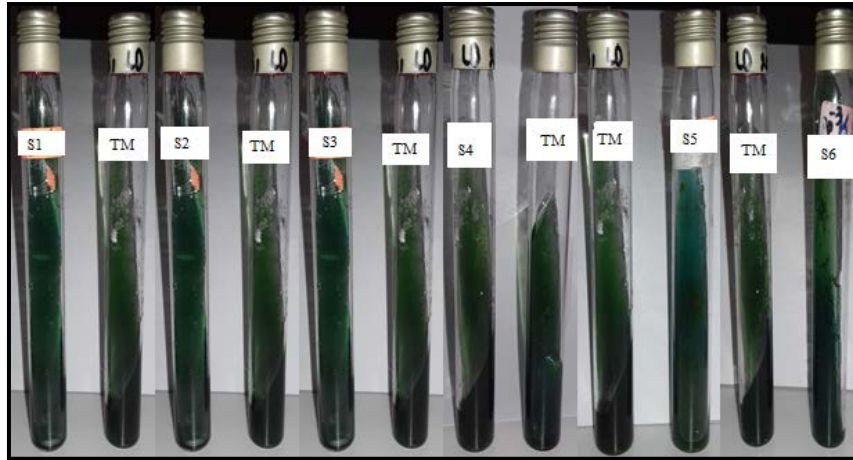


Figure 34 : Test négatif d'utilisation de citrate en présence des six isolats de *Streptomyces* sp.

➤ **Les réactions de VP et RM :**

Les tests de VP et RM sont positifs, la couleur à virer vers le rouge (fig. 35). Les souches d'actinomycètes (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) assurent les réactions de VP et RM des acides mixtes en présence du réactif RM et butylène glycolique avec VP. Les mêmes résultats sont obtenus par plusieurs chercheurs **Kannabira et Deepika, (2009)**, **Dhananjeyan et al. (2010)** ; **Vengadesh et al., (2011)** et **Kalyani et al. (2012)**.

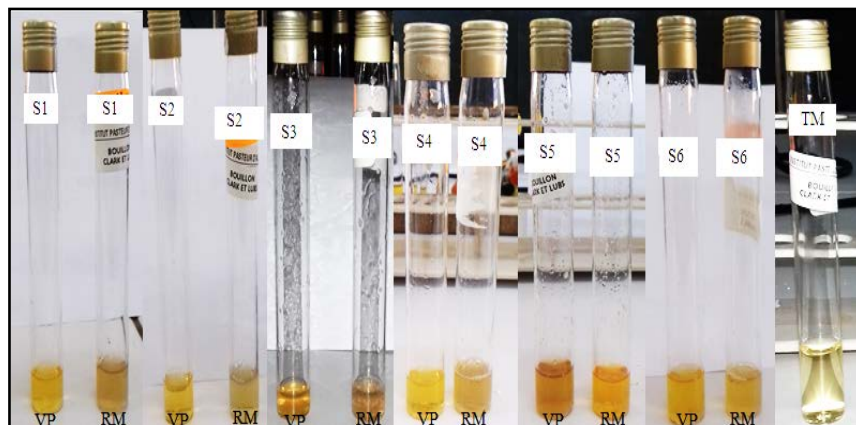


Figure 35 : Tests de VP et RM positifs pour les souches d'actinobactéries.

4. Fermentation submergée

L'évolution des poids pondéraux de la masse microbienne a été suivie en milieu liquide Bennett pendant 8 jours en présence des isolats d'actinomycètes (fig. 36).

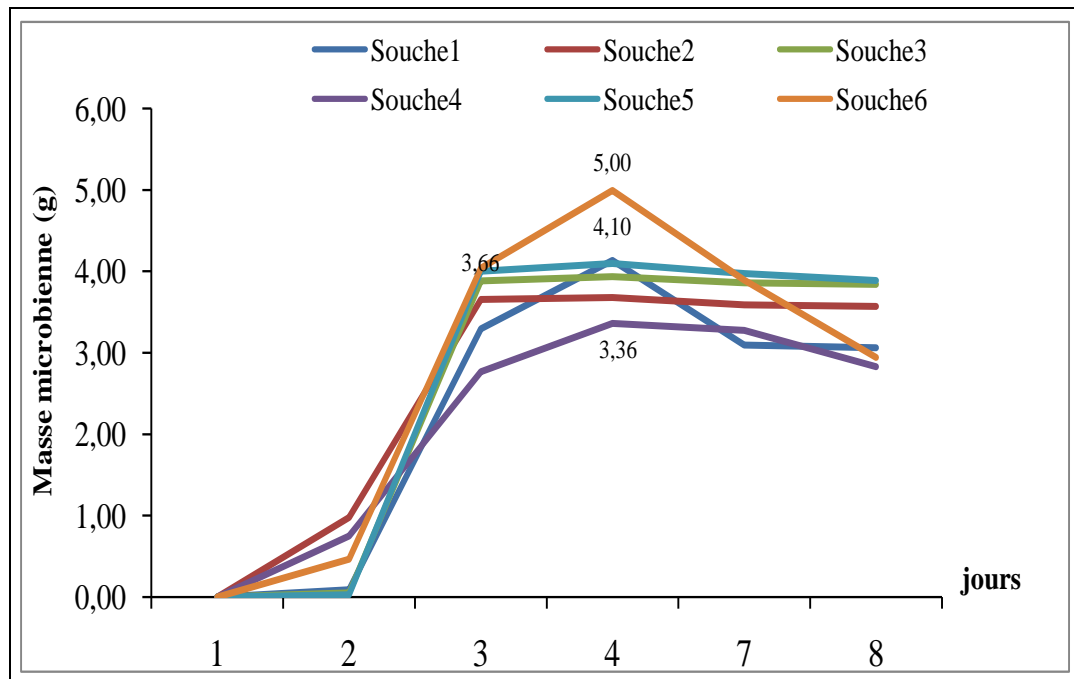


Figure 36 : L'évolution des poids pondéraux de la masse microbienne des isolats d'actinobactéries.

La figure ci-dessus montre clairement qu'à partir du 2^{ème} jours la masse microbienne augmente pour l'ensemble des souches d'actinomycètes. Cette évaluation indique que la phase exponentielle de la fermentation est variable selon les isolats. Les souches 2, 3 et 5 présentent presque la même phase rapide, elle est située entre le 2^{ème} et le 3^{ème} jours avec des masses légèrement variables respectivement 3,6, 3,9 et 4,1 g. Pour les autres isolats (S1, S4, et S6) cette phase est un peu prolongée, elle a duré environ 4 jours (fig. 36). La biomasse microbienne pour ces isolats est très variable, la plus faible masse est enregistré pour la souche 1 avec une valeur de 3,3 g, cette valeur augmente pour les souches 4 et 6 respectivement de 4,1 et 5g. Les souches entrent pratiquement dans la phase stationnaire à partir du 3^{ème} et 7^{ème} jour où on a noté une stabilisation de la masse microbienne respectivement pour les isolats (S2, S3 et S5) et les isolats (S1, S4 et S6) (fig. 36).

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.

5. Les rendements des extractions d'ATB et de l'huile

➤ Les rendements des extractions d'ATB

Les résultats de l'utilisation des différents isolats de *Streptomyces sp* (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) pour produire les ATB correspondent aux résultats des tests d'antagonismes. On a remarqué que les souches S2 et S3 présentent respectivement des pourcentages élevés des ATB de $0,56 \pm 0,74$ et $0,55 \pm 0,71$ g (fig. 37 et fig. 38). Concernant, les souches S1, S4, S5 et S6 la synthèse des ATB est très faible par rapport aux isolats S2 et S3 (fig. 38).

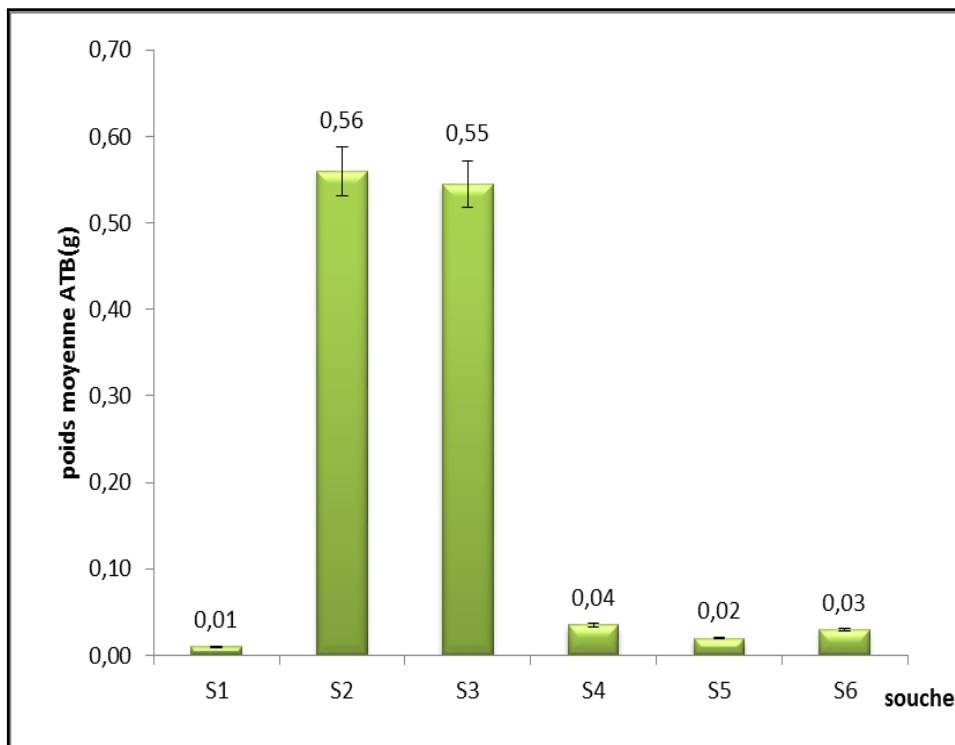


Figure 37 : Les rendements moyens en poids des ATB des isolats de *Streptomyces sp*.



Figure 38 : Les poudres d'antibiotiques récupérés sont de couleur blanche.

Les résultats des ATB obtenus avec les différents isolats se rapprochent de ceux de (Saravana et al., 2012).

➤ **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* (S1, S2, S3, S4, S5 et S6) et présentés dans la figure ci-dessous :

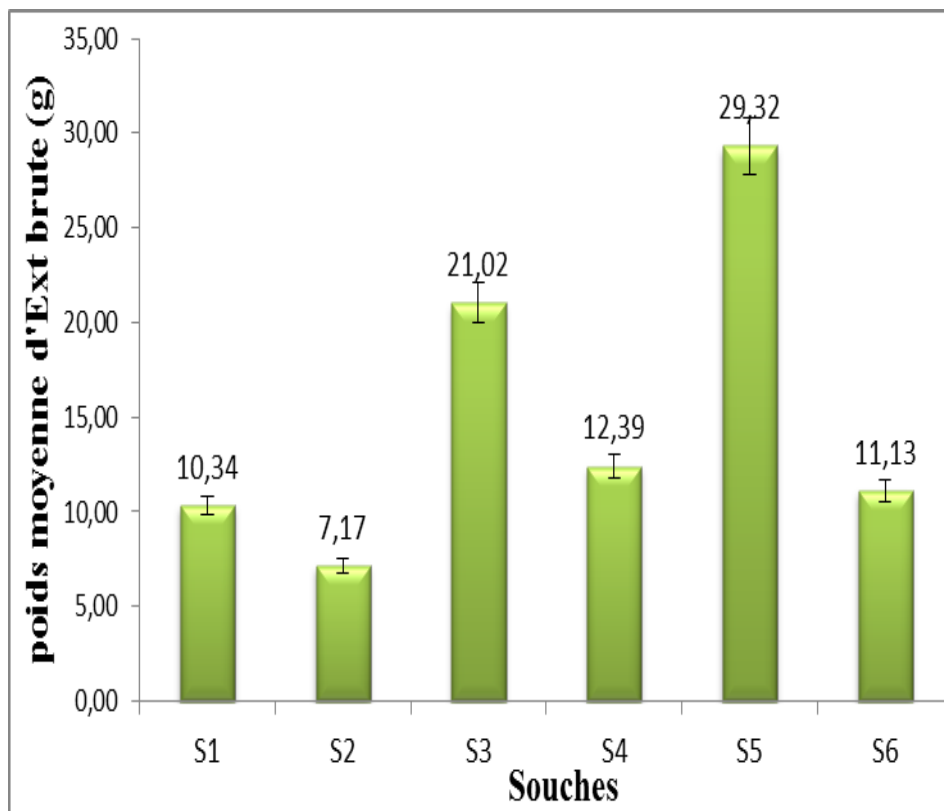


Figure 39 : Les rendements moyens en poids des huiles brutes des isolats de *Streptomyces sp*.

Toutefois, les huiles brutes des souches de *Streptomyces sp* présentent des rendements dix fois plus élevés par rapport aux rendements des ATB (fig. 39 et 40).

On a remarqué que les valeurs pondérales des huiles sécrétés par les souches S5 et S3 sont plus élevées comparant avec les autres souches et sont respectivement de $29,32 \pm 14,84$ g et $21,02 \pm 21,78$ g (fig.40).

Toutes les huiles des souches présentent une couleur jaune foncé à l'exception de la souche S1 dont la couleur de son l'huile est jaune limpide (fig. 40). L'huile présente une odeur légère et un aspect moins visqueux.



Figure 40 : Couleur des huiles brutes de *Streptomyces sp*
(Couleur jaune S1, Couleur jaune foncé S3).

De même, les autres souches présentent des rendements pondéraux qui restent intéressants, dont les valeurs sont de $12,39 \pm 9,77$; $11,13 \pm 0,02$; $10,34 \pm 10,66$ et $7,17 \pm 0,32$ g respectivement pour les isolats S4, S6, S1 et S2 (fig. 39). 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 ces résultats n'ont pas été comparés.

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. Le mycélium secondaire se forme lorsque la colonie sera plus âgée. Les hyphes primaires donnent des branches spécialisées qui se développent loin de la surface de la colonie en donnant un mycélium reproductif dans l'air. Ce mycélium est plus épais et peu ramifié, il est protégé par sa paroi hydrophobe et peut se développer sur un milieu pauvre en sources nutritionnelles (Larpent et Sanglier, 1989 et Miguélezetal., 2000). Chez certains actinomycètes, les hyphes végétatifs lorsqu'ils se différencient en hyphes aérien, c'est à ce moment-là que les substances médicamenteuses sont synthétisées (Prescotte et al., 2010).

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

L'évaluation du pouvoir antimicrobien des ATB et des huiles des actinobactéries a été déterminée par les mesures des diamètres d'inhibitions en millimètre autour des disques (fig. 41, fig. 42 et 43).

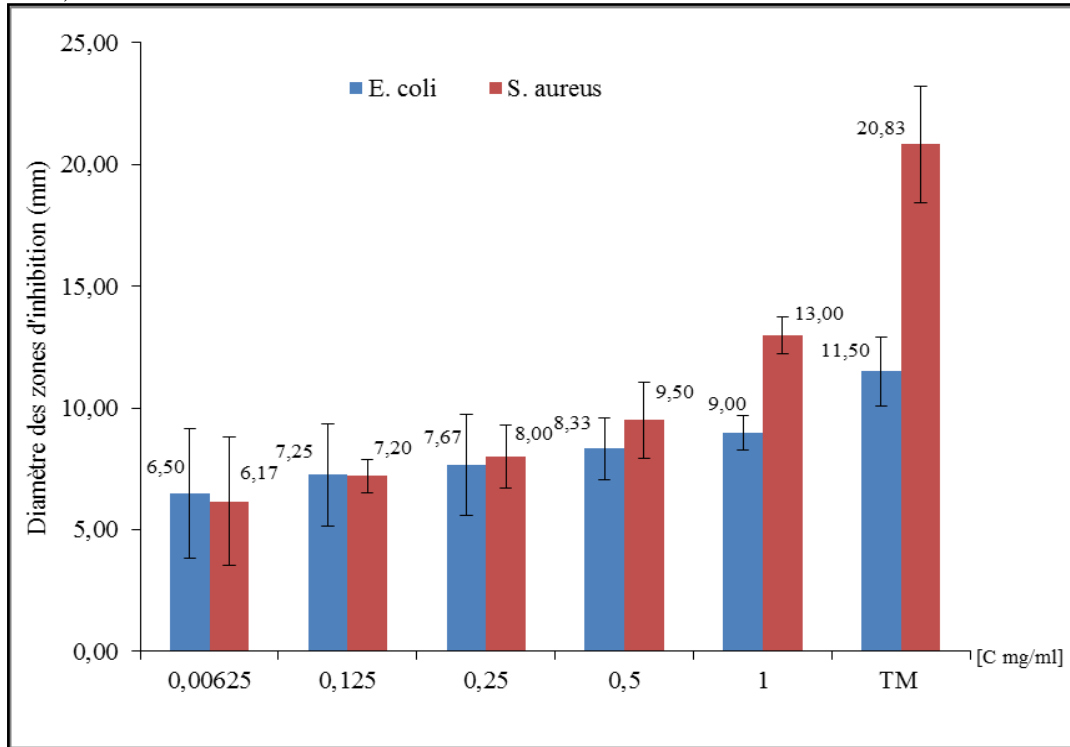


Figure 41 : Les diamètres des zones d'inhibition des ATB de *Sreptomyces sp.*

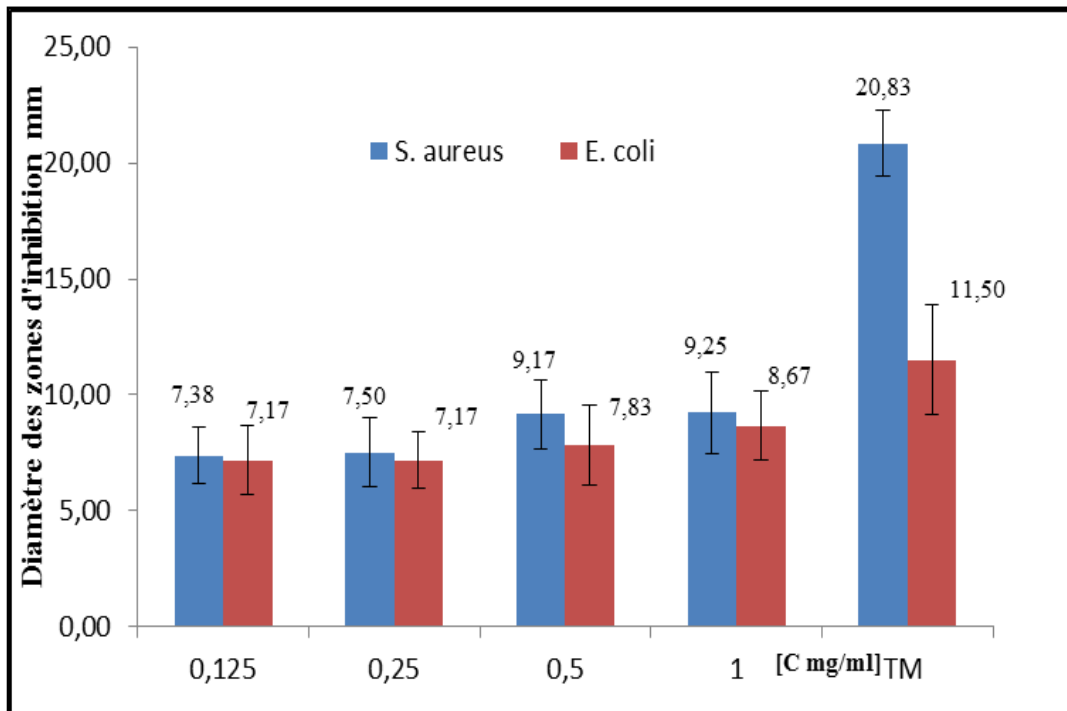


Figure 42 : Les diamètres des zones d'inhibition de l'huile de *Sreptomyces sp.*

Nous avons noté que les diamètres des zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation des concentrations que se soit pour les ATB ou les huiles en présence des deux souches *S. aureus* et *E. coli* (fig. 41, 42 et 43). Les concentrations 1 ; 0,5 et 0,25 mg/ml de l'ATB révèlent un effet antibactérien important avec des diamètres des zones d'inhibition supérieurs respectivement $13 \pm 2,65$; $9,5 \pm 0,71$ et $8 \pm 1,13$ mm vis-à-vis *S. aureus* (fig. 41 et fig. 43).

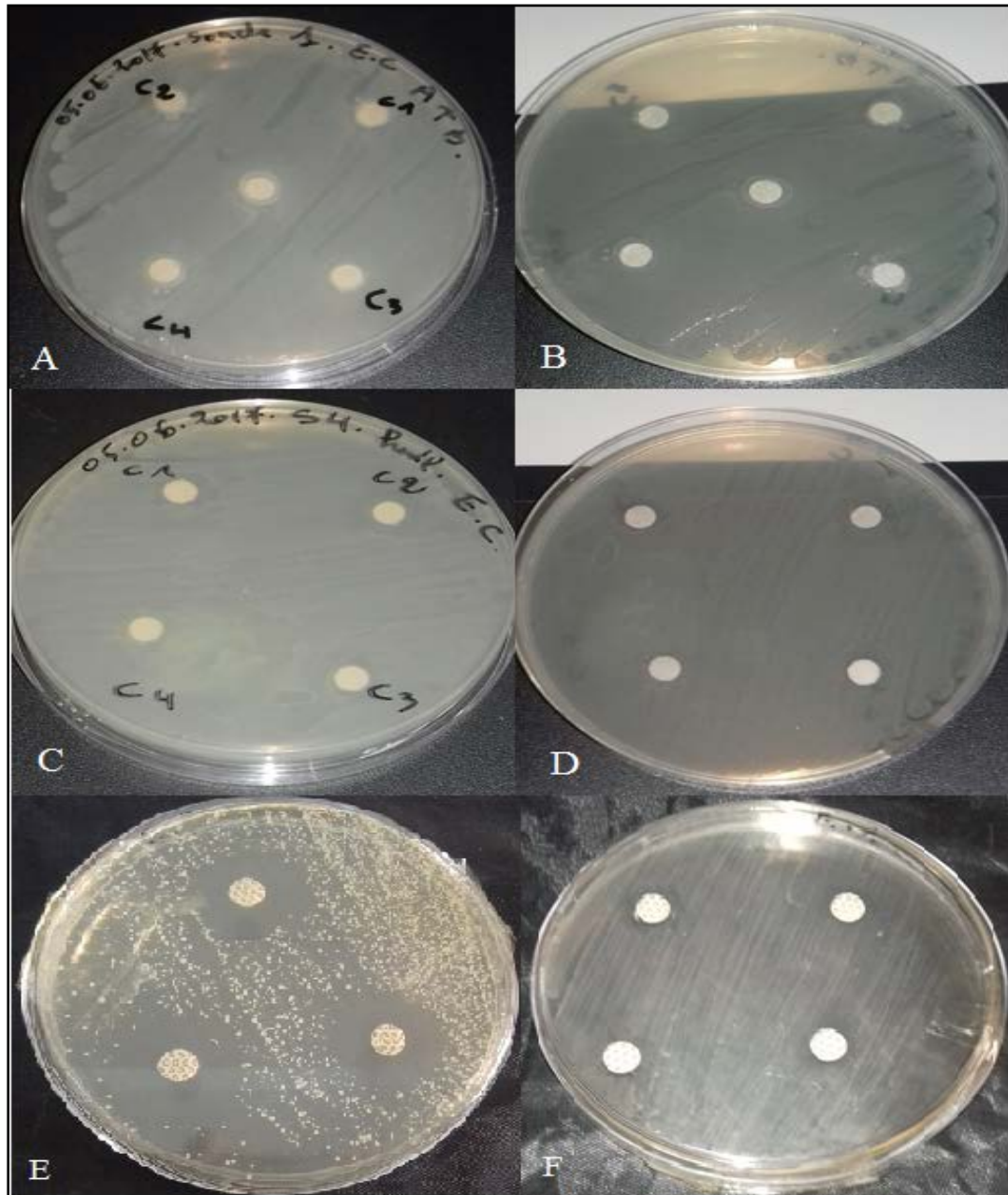


Figure 43 : Tests antibiogramme des extraits d'ATB et de l'huile brute.

A et B: Extrait ATB en présence *S. aureus* et *E.coli* ;

C et D : Huile brute en présence *S. aureus* et *E.coli* ;

E et F : Cultures témoins en présence *S. aureus* et *E.coli*.

Les mêmes remarques soulevées précédemment sont enregistrées concernant l'effet antibactérien de l'huile brute de *Streptomyces sp*, vis-à-vis les différents germes, sauf que, ici cette inhibition a été moins marquée même à des doses fortes par rapport à l'ATB (fig. 40 et fig. 41).

Toutefois, la CMI et la CMB de l'ATB sont respectivement 0,125 et 0,5 mg/ml pour la souche *S. aureus*, concernant, la souche *E. coli* la CMI égale la CMB = 0,5 mg/ml. Le rapport CMB/CMI montre la relation entre la CMB et CMI qui est égale à 4 pour la souche *S. aureus*. Le rapport CMB/CMI compris entre 4 et 8 traduit une action bactéricide de l'ATB. Par contre, l'ATB est bactériostatique contre *E. coli* le rapport CMB/CMI égale à 1.

Cependant, les CMI et CMB de l'huile sont respectivement pour les souches *S. aureus* de 0,25 et 1mg/ml et pour *E. coli* 0,5 et 1mg/ml. Les rapports des CMB/CMI indiquent les valeurs de 4 et 2 respectivement pour les souches *S. aureus* et *E. coli*. On remarque que l'effet antibactérien de l'huile vis-à-vis les deux souches pathogènes se ressemble de celui de l'ATB, l'huile est bactéricide contre *S. aureus* et bactériostatique *E. coli*.

En général, la souche *S. aureus* s'avère très sensible, les diamètres des zones d'inhibition varie de 13 à 6,5 mm et de 9 à 7 mm respectivement pour les deux extraits de *Streptomyces sp* l'ATB et l'huile par rapport à la souche *E. coli* respectivement 9 à 6 mm et 8 à 6 mm (fig. 41, 42 et 43).

Il n'est pas surprenant d'observer un tel comportement car ces bactéries (*E. coli*) sont bien connues pour leur résistance à une large gamme de biocide à cause de la composition chimique de leur paroi peptidoglycane (**Tortora et al., 2003**). Certaines études établis sur les ATB des *Streptomycines sp* confirment les résultats obtenus tels que (**Iwai et Omura, 1982 ; Brooks et al., 1995 ; Madigan et al., 1997**) **Kannabiran et Deepika, 2009 ; Djananjeyan et al., 2010**

En ce qui concerne les huiles brutes de *Streptomyces sp* et leur activité antimicrobienne aucune information malheureusement n'a été trouvé. L'importante activité biologique des deux extraits d'ATB et de l'huile de *Streptomyces sp* peut être attribuée principalement à leurs compositions chimiques bioactives tels que les groupements β - lactamines, glycopeptides, aminosides, macrolides et quinolones, les insaponifiables et les tocophérols . Ces molécules d'antibiotiques sont largement utilisées pour leurs effets chimio thérapeutiques. Elles peuvent aussi être employé dans les différents domaines agroalimentaires comme des ralentisseurs ou des inhibiteurs de l'oxydation des produits alimentaires en empêchant l'altération des aliments et inhibant la croissance de certains germes pathogènes. Toutefois, on ne peut pas comparer les CIM des deux extraits qui sont nettement faibles avec les normes national du comité clinical labo tory standards (NCCLS) qui indique qu'une substance est antibiotique sa C.I.M est inférieur à 256 mg/ml (**Ferron, 1979**). On peut dire que l'action antibactérienne des extraits bruts est complexe comme tout phénomène biologique.

Conclusion et Perspectives

Conclusion et Perspectives

Les résultats montrent que le traitement des sols avec le CaCO_3 donne un bon isolement des actinomycètes avec un nombre de colonie de $1,1 \times 10^6$ UFC/ml. Toutefois, ce prétraitement a réduit les différentes contaminations par rapport aux sols non traités avec le CaCO_3 . Les colonies obtenues ont des tailles différentes petite, moyenne et grande dont 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.

La seconde étape était la purification des onze isolats sur le milieu nutritif gélosé pour la vérification de leurs puretés. Les souches d'actinomycètes présélectionnés sont pures, et leur examen microscopique a révélé que les bactéries sont de Gram positif. Leurs mycéliums végétatifs présentent des structures cloisonnées avec un nombre limités de sporanges, qui sont des sacs contenant des endospores.

Les tests d'antagonismes présentent six souches d'actinomycètes productrices des substances bioactives, ces souches présentant un pourcentage de 54,54%. L'effet antibactérien est très remarquable contre *S. aureus*, les diamètres de zones d'inhibition varient de 2 à 4 cm.

Les tests physiologiques (l'hydrolyse de la caséine, l'amidon) et les tests biochimiques (l'hydrolyse de la gélatine, la production de H_2S , tests de catalase et la réduction des nitrates pour S4) sont positifs à l'exception de quelques tests tels que la dégradation de l'urée, l'utilisation de citrate et la catalase de S6 qui sont négatifs.

La biomasse microbienne des isolats obtenu est très variable, la plus faible masse est enregistré pour la souche 1 avec une valeur de 3,3 g, cette valeur augmente pour les souches 4 et 6 respectivement de 4,1 et 5g. Les souches entrent pratiquement dans la phase stationnaire à partir du 3^{ème} et 7^{ème} jour où on a noté une stabilisation de la masse microbienne.

Les résultats de l'utilisation des différents isolats de *Streptomyces sp* dans la production des ATB correspondent aux résultats des tests d'antagonismes. On a remarqué que les souches S2 et S3 présentent respectivement des pourcentages élevés des ATB de $0,56 \pm 0,74$ et $0,55 \pm 0,71$ g. Concernant, les souches S1, S4, S5 et S6 la synthèse des ATB reste très faible.

Toutefois, les huiles brutes des souches de *Streptomyces sp* présentent des rendements dix fois plus élevés par rapport aux rendements des ATB. Les valeurs pondérales des huiles sécrétés par les souches S5 et S3 sont les plus élevées ($29,32 \pm 14,84$ g et $21,02 \pm 21,78$ g) comparant avec les autres souches.

Les diamètres des zones d'inhibition augmentent avec l'augmentation des concentrations que se soit pour les ATB ou les huiles en présence des deux souches *S. aureus* et *E. coli*.

Toutefois, la CMI et la CMB de l'ATB sont respectivement 0,125 et 0,5 mg/ml pour la souche *S. aureus*. Concernant, la souche *E. coli* la CMI égale la CMB = 0,5 mg/ml. Le rapport CMB/CMI montre une action bactéricide de l'ATB contre *S. aureus* et bactériostatique contre *E. coli*. Cependant, les CMI et CMB de l'huile sont respectivement pour les souches *S. aureus* et *E. coli* de (0,25 mg/ml ; 1mg/ml) et de (0,5 mg/ml ; 1mg/ml). Les rapports des CMB/CMI indiquent un effet bactéricide contre *S. aureus* et bactériostatiques contre *E. coli*.

Toutefois, l'identification des six isolats d'actinomycètes nécessite l'utilisation d'autres milieux plus sélectifs que le milieu l'amidon caséine agar, pour une bonne exploitation.

De nombreuses perspectives découlent de ce travail :

- La purification complète des molécules produites (ATB et l'huile) par la HPLC et CG;
- La déterminer des structures par l'utilisation les techniques IR, SM et RMN ;
- Poursuivre l'identification moléculaire des isolats pour la confirmation de leur apparenté phylogénique.
- La réalisation des tester *in vivo* de la toxicité des antibiotiques et des huiles sécrétés sur des animaux et végétaux.

Références
Bibliographiques

Références bibliographiques

1. **Adelaide, Australia (20- 25 September 1998).** International Humic substances society. J. In. Microbiol.Biotechnol. 37:35-41.
2. **Alexander M., 1994.** Biodegradation and Bioremediation. Academic Press, New York (USA).).Thèse : Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna)
3. **Amaral C, 2002.** Production and partial characterization of xylanase from Amylase from a novel isolate Streptomyces gulbargensis. J ind microbiol biotechnol,
4. **Anderson A.S. and Wellington E.M.H., 2001.** The taxonomy of streptomyces and related Antifungal strains of the Streptomyces violaceusniger clade active against candida Appl& environ microb. 74: 3877-3886.
5. **Antoni A, Bourgogne C., 2012.** Guide pratique pour la description des sols de France CEN Bourgogne. 74: 3877-3886.
6. **Atlas R. M. and Bartha R., 1992.** Microbial ecology. Fundamentals and applications. 3rd edition. The Benjamin/Cummings Publishing Company. San Francisco, California (USA), p563. Mémoire : Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna).
7. **Atta H.M., Dabour S.M. and Desoukey S.G., 2009.** Sparsomycin antibiotic production by Streptomyces sp. AZ-NIOFDI: Taxonomy, fermentation, purification and biological activity. J Agric& Environ Sci. 5(3) : 368-377.Thèse : recherche de l'activité anti pathogène chez les espèces du genre streptomycètes isolé de différents biotopes. Page 53. Effet de prétraitement.
8. **Bakken, L. R., 1997.** Culturable and nonculturable bacteria in soil. In: Van Elsas J. D, Trevors J. T. & Wellington E. M. H. (eds) *Modem soil microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 4761. Thèse:Interactions entre la communauté microbienne du sol,(bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes.
9. **Baldock et Skjemstad 1999 In Krull et al., 1999.** All organic materials found in soils irrespective of origin or state of decomposition », p5.
10. **Ben Ameer M., Sioud R., Fourati S., Ben Fguira L., Bejar S., et Mellouli L., 2001.** Streptomyces mexicanus, a xylanolytic microorganism isolated from soil. Int j sys budevo Streptomyces sp. Strain amt-3 isolated from brazilincerrado soil. Enzyme microb technol. 31: 549-555.

11. **Berdy J., 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J antibiot.* 58 :1-26. Biological studies of halophilic streptomyces sp. Isolated from saltpan environment. *Am j Biotechnol.* 8 (13): 3007-3017.
12. **Berdy J., 2005.** Bioactive microbial metabolites. *J antibiot.* 58 :1-26.
13. **Berthelin 1. and Toutain F., 1979.** Biologie des sols. In Duchaufour P. & Souchier B (eds) *Pédologie. 2. Constituants et propriétés du sol.* Masson, Paris. 121-160.
14. **Bringmann G., 2003.** Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound Controlling effects on root-rot of wheat. *J. Gen. Microbiol.* 14: 440-448.
15. **Brooks G.F., Butel G.S. et Auruston L.N., 1995.** *Medical Microbiology.* Printice Hall
16. **Buchanan, R.E., 1918.** Life phases in a bacterial culture. *J. Infect. Dis.* 98, 1271-1273. in Jean-Christophe Augustin **Thèse** Modélisation de la croissance microbienne
17. **Hilliard C. et Reedyk S., Avril 2000.** Texture du sol et qualité de l'eau.
18. **Calvet R(2000).** Le sol propriétés et fonctions, constitution et structure, phénomènes aux interfaces. Tome 1. Edition France Agricole. Paris (France), 83-90. **Thèse :** Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna).
19. **Chenu C., 1993.** Clay or sand polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure. *Geoderma.* 56) mémoire : Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere.
20. **Chenu, 2003.** "Comment caractériser les matières organiques du sol ?" In Les fertilités du sol et les systèmes de culture. Edité par G Thevenet (COMIFER) : **p109)**
21. **Faedy L., GEMAS 2003.** Gestion des matières organiques dans les sols cultivés en Région wallonne : avantages agronomiques, avantages environnementaux et séquestration du carbone. p107-116.
22. **Dastager G. S., Agasar D. Etpandey A., 2009.** Production and partial purification of actinomycete.
23. **De Rooter P. C., Van Veen, J. A., Moore, J. c., Brussaard, L. and Hunt, H. W., 1993.** Calculation of nitrogen mineralization in soil food webs. *Plant and soil* 157,263-273. **Thèse:** Interactions entre la communauté microbienne du sol, (bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactérovores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes.

24. **Deoblad J. F., Bailey et Morra M. J., 2002.** Novel plant-microbe rhizosphere.
25. **Dietera A., Hamm A., Fiedlerh. P., Goodfellow M., Mullerw. E., Brun R., 1990.** Differentiation and antibiotic production in submerged culture of streptomycescoelicolor. Et strategie de selection de souches. Bull soc frmicrobiol. 12: 13.
26. **Duprarque A, Rigalle P., 2011 :** Composition des MO et turn over et fonctions des MO.Expression of Streptomyces antibiotic biosynthetic gene clusters. BMC Microbiology 2011, 11:243.
27. **Fabien A., Aline D., Denis F., Jérôme G., Florian M-Blondin et Christian V., 2015.** Rapport du Réseau Thématique Pluridisciplinaire « Sols ».p :7-68
28. **Focht, D et Martin, J. P. 1979.** Microbiological and Biochemical Aspects of Semi-arid agricultural soils. In: Hall A. E., Canne!! G. H. &Lawton H. W. Agriculture in Semiarid Environment. Springer-Verl ag, Berl in. 1 9-147.
29. **Fred P et Olivier N., 2011.** Enseignants à l'ente d'Aix-en-ProvenceSylvieNicaise, laboratoire du cette méditerranée carole portillon et mathieuvermeulen, école des mines de douai. La classification des sols... (Géotechnique routière)
30. **Frontier S., et Pichod-Viale D., 1995.** *Ecosystemes. Structure, fonctionnement, évolution.* 2^{ème} édition. Masson, Paris. 447 p. Thèse : Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes.
31. **Getha k., Vikineswary S., Wong W.H., Seki T., Ward A. and Goodfellow M 2005.** Strategies de selection de souches. Bull socfrmicrobiol. 12: 13.
32. **Gobat J.M, Aragnom., Matthey W. 1998.** Le Sol vivant. Bases de pédologie biologie des sols. Presses Polytechniques et Universitaires Romandes, Lausanne. Gestion des matières organiques dans les sols cultivés en Région wallonne : avantages agronomiques, avantages environnementaux et séquestration du carbone.
33. **Guiraud J.P. 1998.** Techniques d'analyse microbiologique, dans : Microbiologie alimentaire. Dunod Paris: 171-334.
34. **Hasavada S. H., Thumar J. T. et Singh S. P., 2006.** Secretion of a potent antibiotic by salt-tolerant and alkaliphilicactinomycete Streptomyces sannanensis strain RJT-1. Current Science. 91(10): 1393-1397. **In thèse:** Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre Streptomyces, isolées de Sebkh. Page 62. Activité antimicrobienne.

35. **Hasegawa S., A. Meguro M., Shimizu T. Nishimura and Kunoh H., 2006.** Endophyticactinomycetes and their interactions with host plants. *Actinomycetol.* 20 (2): 72-81.
36. **Hawker L. E. and linton H., 1971.** Mico-organismes. P: 325-333.
37. **Hawksworth D. L. and Mound, 1991.** Biodiversity databases: the crucial significance of collections. In Hawksworth D. L. (ed.) *The biodiversity of microorganisms and invertebrates: its role in sustainable agriculture.* CAB International. Wallington, UK. 17-29. **Thèse:** Interactions entre la communauté microbienne du sol,(bactéries et champignons mycorrhiziens) et les nématodes bactéricivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes
38. **Hélène C and Hubert B., 2014.** Usages des antibiotiques en élevage et filières viandes. (CIV) centre d'information des viandes. hierarchic classification system Actinobacteria classis Nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 479-
39. **Holt J.G., Kriegn R., Sneathp H.A., Staley J.T. and Williams S.T., 1994.** Bergey's manual of determinative bacteriology, 9th edition, williams and wilkins, baltimore, p. 2340–2343
40. **Hopwood d. A (1999).** Forty years of genetic with Streptomyces: from in vivo through in *Infect dis.* 5 (3): 207-213.
41. **Hopwood D.A., Bibb M.J., Chaterk F., Kieser T., Brutonc J., Kieserh M., Lydiated J., Johnson J.A., Onderdonka B., Cosimil A., Yawetz S., Laskerb A., bolcens J., Brown J.M. and Martyf M., 2011.** Gordoniabronchialis bacteremia and pleural infection: case report and review of the literature. *J. Clin. Microbiol.* 49(4): 1662–1666.
42. **Huwe B., 2003.** The role of soil tillage for soil structure. In A. El Titi, ed. *Soil Tillage in Agroecosystems.* CRC Press LLC, Boca Raton p. 27-50. **Thèse :** Etude comparative des effets de travail du sol conventionnel et le semis direct sur l'évolution du sol en region semi-aride.
43. **Hwang B.K., Lims W., Kimb S., Lee J.Y. and Moon S.S., 2001.** Isolation and in vivo In streptomyces lividans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4731-4739.
44. **Mirsal I., (2004).** Soil pollution origine, monitoring and remédiation springerverlag berlin heidelberg. **Thème** de mémoire :étude pédologique et floristique de différentes sols selon un gradient de pollution.
45. **Ife J.C., 2012.** Comprendre la formation et la fertilité des sols In streptomyces lividans. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(10): 4731-4739.

46. **Info fiches sur les potagers (23/05/2012).** Analyse et amendement du sol International Inc. USA: 137-149
47. **Iwai W. et Omura S., 1982.** Culture conditions for screening of new antibiotics. *J Antibiot.* 35: 123-141.
48. **Larpent J.P., Sanglier J.J., 1989.** Bbiotechnologie des antibiotiques. Masson Paris Milan Barcelone Mexico. p .1 :21 :104 :106
49. **Lavigne J.P., 2007.** effets des antibiotiques et mécanismes de résistances. MB7 : bactériologie.
50. **Kang M.J., Strap J. L. and Crawford D. L., 2010.** Isolation and characterization of potent Interaction involving streptomyces lydicus wyec108 and the pea plant (pisum). *J. biotechnol.* 7(18): 3225-3230
51. **Kretzschmar A., 1993.** "Action sur la structure et le fonctionnement physique du sol". In Mémento du producteur la matière organique, Editions S.E.R.A.I.L. et l'Information Agricole du Rhône. Gestion des matières organiques dans les sols cultivés en Région wallonne : avantages agronomiques, avantages environnementaux et séquestration du carbone
52. **Iakshmipathy D. T. and Kannabiran K, 2009.** A morphological, biochemical and *Microbiol.* 53: 269-273.
53. **Iarpent J.P. et Sanglier J.J., 1989.** Biotechnologie des antibiotiques. 2^{eme} Ed. Masson, Maximal production by actinomycetes. *Int. J. Adv. Res.* 2 (1): 485-491.
54. **Laurent D., Georges D., Ysabelle A., Sébastien C., Antoine C., 2012.** Les modèles de croissance en microbiologie prévisionnelle
55. **Lavelle P. and Spain A.V., 2001.** *Soil Ecology.* Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. P 654). **These** (Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes).
56. **Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P., 1981.** Introduction to the order Actinomycetales.
57. **Nieminen L., Steven W., Margaret C. M., Smith, Paul A., Hoskisson., 2013.** A Flexible Mathematical Model Platform for Studying Branching Networks: Experimentally Validated Using the Model Actinomycete, *Streptomyces coelicolor.* articleplos one vol 8:1-14.
58. **Lemaire F., 1993.** "Rôle de la matière organique dans l'alimentation minérale des plantes". In Mémento du producteur la matière organique, Editions S.E.R.A.I.L. et

- l'Information Agricole du Rhône. Gestion des matières organiques dans les sols cultivés en Région wallonne : avantages agronomiques, avantages environnementaux et séquestration du carbone
59. **Leung K. T., Errampalli D., Cassidy M., Lee H., Hall B., Trevors J. T., Okamura H., and Bach H.-J., 1997.** A case study of bioremediation of polluted soil: biodegradation and toxicity of chlorophenols in soil. In: Van Eisas J. D, Trevors J. T & Wellington E. M. H. (eds) *Modern soil microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 577-605.
60. **Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yague P. and Sanchez J., 2008.** Mycelium Of a new extracellular lipase from streptomyces cinnamomeus. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9): 3553-3560.
61. **Marinelli f., 2009.** antibiotics and streptomyces: the futur and antibiotic discovery, *Microbiology today.* 2: 20-23.
62. **Moore J. C. and Ruitter K. H., 1991.** Temporal and spatial heterogeneity of trophic interactions within below-ground food-web. *Agriculture, Ecosystems and Environment* 34,371391.
63. **Mustin M., 1987.** Le compost, gestion de la matière organique. Editions François Dubusc, Paris. Mémoire IGEAT 2006-2007
64. **Nascimento P., Coelho R.R., Marques S., Alves I., Girio F.M. et Newly., 2004.** Isolated streptomyces sp. Tn.97 strain. *Process biochem.* 41: 1506-1513.
65. **Normand, P., Navaro I. and Domenach A. M., 2000.** La symbiose fixatrice d'azote Frankia plantes actinorhiziennes. *Bulletin de la Société Française de Microbiologie* 15,241-244. Interactions entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactérivores: effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes.
66. **Oades J.M., 1998.** Particulate Organic Matter. In *Humic Substances Downunder* :Of a new extracellular lipase from streptomyces cinnamomeus. *Appl. Environ. Microbiol.* 63(9): 3553-3560.
67. **Orléans V., Antoni D., Baize O., Bertel O., Duval, Anne Richer de Forges, 2008.** Fête de la Science Impression : www.ciril.fr
68. **Oskay M., 2009.** Antifungal and antibacterial compound from streptomyces strains. *Afr j Paris* 481 p.

69. **Parent M.E and Velegol D., 2004.** E. coli adhesion to silica in the presence of humic acid. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 39: 45-51. Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere Paris 481 p.
70. **Paul E. A. and Clark F. E., 1996.** Soil microbiology and biochemistry. 2nd edition. Academic Press. San Diego, California (USA), 340.) Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna).
71. **Petrosyan P., Gartia-Varela M., Luz-madrigo M., Huitron C. and Flores M.E., 2003.** Of novel bioactive metabolites. *Microbiol. Res.* 167 (10): 571-580
72. **Polard E., 2006.** La pharmacovigilance des antibiotiques ; exemples de quelques effets indésirables rapportés avec les betalactamines, les fluoroquinolones, les macrolides et les cyclines.
73. Pour la maîtrise de la sécurité des aliments (synthèse bibliographique). *Biotechnol. Agron. Soc. Environ.* 2012 16(3), 369-381
74. **Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., 2010.** Microbiologie. De boeck : bruxelles. 2^{eme} edition pp: 1088.
75. **Pridham T.G., 1965.** Colour and streptomycetes. Report of an international Produced by a novel alkaliphilic streptomyces strain. *J antibiot.* 56: 639-46.
76. **Quénéa K., 2004.** Étude structurale et dynamique des fractions lipidiques et organiques réfractaires de sols d'une chrono séquence forêt/maïs (CESTAS, Sud-ouest de la France).
77. **Rawls W.J., Pachepsky Y.A., Ritchie J.C., Sobecki T.M. and Bloodworth H., 2003.** Effect of soil organic carbon on soil water retention. *Geoderma* 116, 61-76.
78. **Robert M., Chenu C., 1992.** Interactions between soil minerals and microorganisms, in Stotzky. G., Bollag, J.M. (Eds) *Soil Biochemistry* 307-404. Diversité bactérienne des sols : accès aux populations à effectifs moniritaires « the rare biosphere »
79. **Roger-Estrade J., Richard G., Caneill J., Boizard H., Coquet Y., Defossez P., and Manichon H., 2000.** Morphological characterisation of soil structure in tilled fields: from a diagnosis method to the modelling of structural changes over time. *Soil & Tillage Research*, 79, 33-49. thèse : étude comparative des effets de travail du sol conventionnel et le semis direct sur l'évolution du sol en région semi-aride.
80. **Sanglier J.J. et Trujillom., 1997.** Substances bioactives produites par les actinomycetes (*Sativum*). *Appl. Environ. Microbiol.* 68: 2161-2171

81. **Sayed G., dayanand A., Etpandey., 2009.** Production and partial purification of actinomycète.
82. **Shirling B., and Gottlieb D., 1969.** Cooperative description of type cultures of streptomycetes. Iv. Species descriptions from the second, third and fourth studies. Int. J. Syst. Bacteriol. 19(4): 391–512
83. **Sommer P., Bormann C., and Cötz F., 1997.** Genetic and biochemical characterization *Streptomyces humidus*. Infect dis. 5 (3): 207-213.
84. **Soulas G., Codaccioni P. and Fournier J.C., 1983.** Effect of cross treatment on the subsequent breakdown of 2,4-D, MCPA and 2,4,5-T in the soil. Behaviour of the degrading microbial populations. *Chemosphere*, 12 (7/8): 1101-1106.). Biodégradation du 2,4-dichlorophénol par le microbiote tellurique de la région de Hamla (Batna)
85. **Stackebrandt E., and Schumann P, 2006.** Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria. Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA: 297-321
86. **Stackebrand T.E., Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L., 1997.** Proposal for a new (vol 2). Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922. 36:189-194.491
87. **Stolp H., 1988.** *Microbial Ecology: organisms, habitats, activities*: Camblidge University Press. New York. 308 p.
88. **Syed D.G., Dayanand A. and Pandey A., 2009.** Production and partial purification of workshop and determination of colour of streptomycetes. Appl. Microbiol. 13: 43-61
89. **Thorn G. , 1997.** The fungi in soil. In: Van Eisas J. D, Trevors J. T. & Wellington E. M. H. (eds) *Modem soil microbiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 63-127.
90. **Tokala, R.K., Strap J. L., Jung C.M., Crawford D. L., 2000.** Vitro to in silico (review article). Microbiology. 145: 2183-2202.
91. **Toop E., Vallaey T. and Soulas G., 1997.** Pesticides: Microbial degradation and effects on microorganisms. In: Van Eisas J. D, Trevors J. T. & Wellington E. M. H. (eds) *Modem soilmicrobiology*. Marcel Dekker, INC. New York. 547-575.
92. **UNIFA Edition (2005)« Le sol et ses constituants » Vitro to in silico (review article).** Microbiology. 145: 2183-2202.
93. **Vonothini G., Murugan M., Sivakumar K. Etsudha S., 2008.** Optimization of protease Produced by the genus streptomycetes. Arch microbiol. 176: 386-390.

94. **Watvem G., Tickoo R., Jog M.M., and Bholeb D., 2001.** How many antibiotics are Workshop on determination of colour of streptomycetes. *Appl. Microbiol.* 13: p43- 61
95. **Chen W., and Zhongjun Q., 2011.** Development of a gene cloning system in a fast growing and moderately thermophilic *Streptomyces* species and heterologous
100. **White R.E., 2006.** Principles and practice of soil science. The soil as a natural resource. *Fourth edn: Blackwell Publishing.*
101. **Wopereis, 2008.** Curriculum APRA-GIR : Manuel technique.
102. **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.
103. **Young I.M., Blanchart E., Chenu C., Dangerfield M., Fragoso C., Grimaldi M., Ingram J., and Monrozier L.J., 1998.** The interaction of soil biota and soil structure under global change. *Global Change Biology*, 4, 703-712. **Thèse** : étude comparative des effets de travail du sol conventionnel et le semis direct sur l'évolution du sol en région semi-aride.

Annexes

Annexes

Milieu Bennett

Extrait de levure	2g/l
Extrait de viande.....	1g/l
Peptone	2g/l
Glucose.....	10g/l
Eau distillée	1L

PH = 7,3

Milieu Mueller-Hinton

Agar.....	10g/l
Extrait de viande.....	2g /l
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5g/l
Amidon.....	1,5 g/l
Eau distillée.....	1 L

PH = 7,0

Caséine amidon agar :

- Amidon.....	10g
- Caseine	0,3 g
- KNO ₃	2 g
- K ₂ HPO ₄	2g
- NaCl.....	2 g
- MgSO ₄ .7H ₂ O.....	0,05 g
- CaCO ₃	0,02g
- FeSO ₄ .7H ₂	0,01g
- Agar.....	18g
- Eau distillée	1L

- PH = 7.3.

Gélose nutritive:

Peptone.....	5g
extrait de viande.....	1g
extrait de levure.....	2g
NaCl.....	5g
Agar.....	15g
eau distillée q.s.p.....	1L

PH= 7,5.

Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate.....	1g
Phosphate de dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate magnésium	0,2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée	1L

PH 6,8

Gélose TSI (Triple Sugar Iron)

Peptone de viande.....	15g
Protéase peptone.....	5g
Extrait de viande.....	3g
Extrait de levure	3g
Glucose.....	1g
Saccharose.....	10g
Lactose.....	10g
Citrate de fer ammoniacal.....	0,3g
Chlorure de sodium.....	5g
Sodium thiosulfate.....	0,3g
Rouge de phénol.....	0,05g
Agar	18g
Eau distillée	1L

PH=7,2

Urée- indole

L-tryptophane	3g
Phosphate de dipotassique	1g
Phosphate monopotassique.....	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Rouge de phénol.....	2,5g
Eau distillée	1L

PH =6,8

Bouillon Clark et Lubs

- Peptone.....	5g
- Glucose.....	5g
- Hydrogénophosphate de potassium.....	5g
- Eau distillée	1L

PH = 7,5

Résumé

Les actinobactéries et plus particulièrement les *Streptomyces sp.* représentent une source biologique importante dans la production des métabolites bioactives. Ces molécules sont très employées dans les différents domaines industriels, pharmaceutique etc. Dans ce contexte le choix du sujet a porté sur les *Streptomyces sp.* La présente étude consiste à isoler les actinobactéries du sol de la zone d'Ouillis (Mostaganem).

Après la purification des isolats. Un criblage par le test d'antagonisme est réalisé vis-à-vis des souches *S. aureus* et *E. coli* pour sélectionner les isolats producteurs des substances bioactives. Ces isolats ont été utilisés dans la production de deux métabolites secondaires et primaire (l'antibiotique et l'huile). Les activités antibactériennes des deux extraits bruts obtenus ont été testées contre les mêmes souches pour la détermination des CMI et des CMB.

Les résultats montrent que le traitement des sols avec le CaCO_3 donne un nombre moyen de colonie de $1,1 \times 10^6$ UFC/ml des actinobactéries. Les observations macroscopiques et microscopiques confirment que les onze isolats présentent les caractéristiques des *Streptomyces sp.*, colonies des diamètres différents de 2 à 5 mm. La forme est variable, les mycéliums végétatif et aérien sont de couleurs différentes. Les bactéries sont à Gram positif, leurs mycéliums végétatifs présentent des structures cloisonnées avec un nombre limités de sporanges. Les tests d'antagonismes des souches présentent six isolats d'environ 54,54% producteurs des substances bioactives.

Les résultats des tests physiologiques et biochimiques sont positifs à l'exception de quelques-uns qui sont négatifs tels que la, l'utilisation de citrate et la catalase de la souche S6. La cinétique de la fermentation microbienne a révélée plusieurs phases (latence, exponentielle, stationnaire et décline). Les rendements des antibiotiques varient de 0,01 à $0,56 \pm 0,74$ g et sont très faibles par rapport aux huiles ($29,32 \pm 14,84$ g et $21,02 \pm 21,78$ g). Toutefois, les CMI et CMB de l'ATB sont respectivement de 0,125 et 0,5 mg/ml pour *S. aureus* et pour *E. coli*. la CMI= CMB 0,5 mg/ml. L'huile présente des CMI et CMB respectivement de 0,25 et 1 mg/ml pour *S. aureus* et 0,5 et 1 mg/ml *E. coli*.

A l'issue de cette étude les résultats sont importants et pour une bonne valorisation, ils méritent une étude plus approfondie sur les différents isolats de *Streptomyces sp.* productrices et les extraits bruts de l'ATB de l'huile.

Mots clés : *Streptomyces sp.*, isolement, test antagonisme, tests physiologiques et biochimiques, antibiotiques, huiles, activité antibiogramme

Abstract

Actinobacteria and more particularly *Streptomyces sp.* represent an important biological source in the production of bioactive metabolites. These molecules are widely used in various industrial, pharmaceutical and other fields. The present study consists of isolating the actinomycetes from the soil of the Ouillis area (Mostaganem). After purification of the isolates, the screening by the antagonism test were performed of the against the *S. aureus* and *E. coli* strains to select the isolates producing the bioactive substances. These isolates were used in the production of two secondary and primary metabolites (Antibiotic and oil). The antibacterial activities of the two crude extracts obtained were tested against the same strains for the determination of CMI and CMB

The results show that soil treatment with CaCO_3 gives an average colony count of 1.1×10^6 CFU / ml of actinobacteria. The macroscopic and microscopic observations confirm that the eleven isolates exhibit the characteristics of *Streptomyces sp.*, colonies with different diameters of 2 to 5 mm. The form is variable; the vegetative and aerial mycelia are of different colors. The bacteria are Gram positive; their vegetative mycelia have partitioned structures with a limited number of sporangia.

Strain antagonism tests show six isolates of approximately 54.54% producing bioactive substances. The results of the physiological and biochemical tests are positive with the exceptions of a few that are negative such as citrate use and catalase of the S6 strain. The kinetics of microbial fermentation revealed several phases (latency, exponential, stationary and decline)

Antibiotic yields ranged from 0.01 to 0.56 ± 0.74 g and were very low compared to oils (29.32 ± 14.84 g and 21.02 ± 21.78 g). However, CMI and CMB of the ATB are respectively 0.125 and 0.5 mg / ml for *S. aureus* and the CMI, CMB of the *E. coli* present 0.5 mg / ml. The oil had CMI and CMB of 0.25 and 1 mg / ml respectively for *S. aureus* and 0.5 and 1 mg / ml for *E. coli*.

At the end of this study, the results are important and for a good valorization, they deserve a more detailed study on the different isolates of *Streptomyces sp.* producing and the crude extracts of the ATB and the oil.

Key words: *Streptomyces sp.*, isolation, antagonism test, physiological and biochemical tests, antibiotics, oils, antibiogram activity

ملخص

الفطريات الشعاعية actinobacteries وخصوصاً السبجية *Streptomyces* هي مصدر بيولوجي هام في انتاج الايض الحيوية النشطة. تستخدم هذه الجزيئات في مختلف الميادين الصناعية مثل الادوية. في هذا السياق تم اختيار الموضوع على *Streptomyces*. تتركز هذه الدراسة على عزل وانتقاء البكتيريا الخيطية من تربة منطقة عيد المالك رمضان بمستغانم. تم اختبار هذه البكتيريا ضد بكتيريات ضارة *S. aureus* و *E. coli* لتحديد الفصائل المنتجة للمواد النشطة بيولوجيا. البكتيريا المنتقاة تم استعمالها في انتاج المضادات الحيوية والزيوت. هذه المستخلصات تم اختبارها على نفس البكتيريات الضارة لتحديد نسبة تركيزها المثبطة CMI و CMB.

النتائج اظهرت ان معالجة التربة بكاربونات الكالسيوم تعطي متوسط عدد البكتيريا $1,1 \times 10^6$ خلية/مل. الملاحظات العينية والمجهريّة تؤكد ان أحد عشر فصيلة التي عزلت ذات الاقطار مختلفة (2 الى 5سم) هي من فصيلة *Streptomyces*.

لوحظ ان لون الفطر الخضري MV والجوي MA يتميز بالوان مختلفة وهي مجزأة مع عدد محدود من مبيغات sporange من بين احد عشر فصيلة تم اختبار ستة عزلت على اساس نسبة تثبيطها للبكتيريا الممرضة هذا العدد يمثل 54.54% من مجمل الفصيلة المعزولة. فيما يخص نتائج الاختبارات الفيزيولوجية وبيو كيميائية فإنها ايجابية باستثناء عدد قليل منها.

طريقة تخمر البكتيريا تتم على مراحل (التكيف، نمو سريع=انتاج المثبطات، توقف، تراجع). مردود المضادات الحيوية المتحصل عليه يتراوح ما بين 0,01 و 5,0 ميلي غرام اما الزيت فهي تمثل عشرة اضعافه 84,4 الى 32,29 غرام فيما يخص تراكيز المثبطة لهذه المستخلصات فإنها على التوالي 0,125- 0,5 ميلي غرام ضد *S. aureus* و 0,5- 1 ميلي غرام *E. coli*.

النتائج المتحصل عليها تبقى مهمة وتستحق استعمال مزيد من طرق مختلفة لدراسة أعمق لكي نستطيع استغلالها في شتى المجالات.

الكلمات المفتاحية: السبجية، والعزلة، الاختبارات الفسيولوجية والبيو كيميائية والمضادات الحيوية، والزيوت.