

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère De l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université Mentouri-Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Biochimie et de Microbiologie

N° d'ordre : 236 / Mag / 2011

N° de série : 024 / SN / 2011

MEMOIRE
EN VUE DE L'OBTENTION DU DIPLOME
DE MAGISTER EN MICROBIOLOGIE
Option : Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne

Présenté par :
LOUCIF Karima

Thème

RECHERCHE DE SUBSTANCES
ANTIBACTÉRIENNES À PARTIR D'UNE
COLLECTION DE SOUCHES D'ACTINOMYCÈTES.
CARACTÉRISATION PRÉLIMINAIRE DE
MOLÉCULES BIOACTIVES

Soutenu le :

Devant le jury :

| | | | |
|---------------------|--------------------------|-----------------------|----------------------------|
| Président : | Mr. BOULAHROUF A. | Professeur | Univ. Mentouri-Constantine |
| Rapporteur : | Mr. KITOUNI M. | Maître de conférences | Univ. Mentouri-Constantine |
| Examineur : | Mr. BOUDEMAGH A. | Maître de conférences | Univ. Mentouri-Constantine |
| | Mr. HAMIDECHI A. | Maître de conférences | Univ. Mentouri-Constantine |

2010– 2011

REMERCIEMENTS

Au terme de ces deux années de recherche, je souhaite adresser mes remerciements à tous celles et ceux qui ont participé, de près ou de loin, à cette aventure.

Les travaux présentés dans ce mémoire ont été réalisés au sein du laboratoire de Génie microbiologique et applications de l'université Mentouri de Constantine.

Ces travaux ont été dirigés par Mr. M KITOUNI. Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine. Je le remercie pour m'avoir permis de travailler sur un thème de recherche aussi novateur, riche et passionnant et pour m'avoir su donner les bonnes directions à ces travaux ce qui m'a permis d'obtenir les résultats présentés ici. Merci de m'avoir emmené au bout de cette aventure.

Je remercie très sincèrement Mr A. BOULAHROUF. Professeur à l'université Mentouri de Constantine de m'avoir fait l'honneur d'être le président du jury. Je tiens aussi à le remercier pour ses conseils scientifiques et de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Mes remerciements vont ensuite à une personne reconnue par son regard original et instructif sur ce genre de travaux «Mr A BOUDEMAGH». Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine pour avoir accepté d'être membre de ce jury.

Je voudrais adresser également un grand merci à Mr A. HAMIDECHI. Maître de conférences à l'Université Mentouri de Constantine pour avoir accepté d'être membre de ce jury ainsi que pour son enthousiasme qu'il a manifesté au cours de son enseignement de notre promotion au cours de l'année théorique -Post graduation-.

Parmi ces remerciements, une mention spéciale à Mme Lamia OULMI ep. KITOUNI avec qui j'ai pris un immense plaisir à travailler. Merci pour sa disponibilité, l'enthousiasme qu'elle a manifesté au cours de ces années, et à CHORFI Selma et Abla, et MAROUANE Fateh qui m'ont toujours soutenue dans les diverses difficultés que j'ai rencontrées.

Merci à tous les membres de l'équipe du laboratoire Génie microbiologique et applications qui ont contribué à rendre ces deux années agréables par leurs gentillesse, et leurs immenses générosités. Bien évidemment, je souhaite remercier les membres des laboratoires de l'unité de recherche -Chiab arassas- qui m'ont vraiment aidé : labo de Microbiologie, Mycologie, Biochimie, Ecologie, et Chimie.

DEDICACES

Je dédie ce travail :

A ma très chère MADRE qui me doit toutes mes réussites

A mon cher PEDRO

A mes FRATELLI et SORELLE

Je dédis ce travail à ma promotion de post-graduation, de Microbiologie promotion - 2008-, les étudiants de L. M..D (Master) recueillis au niveau de l'unité de recherche –Chiab arassas-, et mes amis de Biologie et Physiologie animale, Génétique (LOUBNA), et de Biochimie pour leurs bonnes humeurs, leurs coups de gueule, leur joie de vivre.

SOMMAIRE

REMERCIEMENTS

DEDICACE

| | |
|---|----|
| Introduction..... | 1 |
| Revue bibliographique | |
| I /Les infections bactériennes et antibiothérapie..... | 3 |
| I-1/ Situation épidémiologique de l'Algérie..... | 3 |
| I-2/ Antibiothérapie..... | 3 |
| I-2-1/ Définition des antibiotiques..... | 5 |
| I-2-2/ Classification des antibiotiques..... | 5 |
| I-2-3/ Résistance aux antibiotiques..... | 5 |
| I-2-3-1/ Les types de résistance..... | 5 |
| I-2-3-1-1/ La résistance naturelle..... | 5 |
| I-2-3-1-2/ La résistance acquise..... | 5 |
| I-2-3-2/ Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux agents antibactériens..... | 7 |
| I-2-3-2-1/ Diminution de la perméabilité..... | 7 |
| I-2-3-2-2/ Expulsion rapide de l'agent hors de la cellule avant qu'il puisse agir..... | 7 |
| I-2-3-2-3/ La destruction ou l'inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes..... | 7 |
| II/ Les actinomycètes. Généralités..... | 8 |
| II-1/ Caractéristiques morphologiques des actinomycètes..... | 8 |
| II-2/ Classification des actinomycètes..... | 10 |

I

| | |
|---|----|
| I-3/ Le cycle de développement des actinomycètes (exemple type : <i>Streptomyces spp</i>)..... | 10 |
| II-4/ Mycélium du substrat et mycélium aérien des actinomycètes..... | 10 |
| II-5/ Formation des spores par les actinomycètes..... | 12 |
| II-6/ Le matériel génétique des actinomycètes..... | 12 |
| II-7/ L'identification des actinomycètes..... | 12 |
| II-8/ Métabolisme des actinomycètes..... | 14 |
| II-9/ Distribution des actinomycètes dans la nature et pathogénéicité..... | 19 |
| II-10/ Substances bioactives produites par les actinomycètes..... | 21 |
| II-10-1/ Les antibiotiques..... | 21 |
| II-10-2/ Les extrémozymes..... | 23 |
| II-10-3/ L'utilisation des actinomycètes comme bioinsecticides et biopesticides..... | 25 |
| II-11/ Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes..... | 25 |
| II-11-1/ Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes..... | 25 |
| II-11-1-1/ Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques..... | 25 |
| II-11-1-2/ Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques..... | 27 |
| II-11-1-3/ Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques..... | 27 |
| II-11-2/ Effet du pH, de la température et du temps d'incubation..... | 27 |

Partie expérimentale

Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire des molécules bioactives

| | |
|---|----|
| I/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens..... | 30 |
| I-1/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens..... | 30 |
| I-2/Spectre antibactérien..... | 30 |
| I-3/Technique des cylindres d'Agar..... | 30 |
| II/ Choix des milieux optimum de production des substances à activité antibactérienne | 30 |
| III/ Effet du diamètre des cylindres d'agar sur l'apparition des zones d'inhibition..... | 31 |
| IV/ Effet du pH et de la température sur la production d'antibactériens par les souches 21 et 101..... | 31 |
| V/ Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives produites par les souches 21 et 101..... | 32 |
| V-1/ Culture des souches actinomycétales 21 et 101 en milieu solide..... | 32 |
| V-2/ Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits organiques (méthode des disques en papier)..... | 32 |
| VI/ Caractérisation préliminaire des substances à activité antibactérienne produites par les souches 21 et 101..... | 33 |
| VI-1/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction du pH..... | 33 |
| VI-2/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la température..... | 33 |
| VI-3/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la lumière..... | 33 |
| VI-4/ Spectre UV-Visible des molécules bioactives..... | 33 |

| | |
|---|----|
| VI-5/ Essais de séparation et de caractérisation des molécules bioactives produites par les souches actinomycétales 21 et 101..... | 33 |
| VI-5-1/ Concentration des extraits organiques bruts des souches 21 et 101 et évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques..... | 33 |
| VI-5-2/ Chromatographie sur couche mince de silicagel..... | 34 |
| Résultats et discussion | |
| I/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactérien..... | 35 |
| I-1/ Choix des milieux optimum de production des substances à activités antibactériennes..... | 35 |
| I-2/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens..... | 39 |
| II/ Effet du diamètre des cylindres d'Agar sur l'apparition des zones d'inhibition..... | 47 |
| III/ Effet du pH et de la température sur la production d'antibactériens par les souches actinomycétales 21 et 101..... | 56 |
| IV/ Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives produites par les soucheactinomycétales 21 et 101..... | 60 |
| IV-1/ Culture des souches actinomycétales 21 et 101 en milieu solide..... | 60 |
| IV-2/ Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits organiques (méthode des disques en papier)..... | 60 |
| V/ Caractérisation préliminaire des substances à activité antibactérienne produites par les souches actinomycétales 21et 101..... | 67 |
| V-1/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction du pH..... | 67 |
| V-2/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la température..... | 71 |

| | |
|--|-----|
| V-3/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la lumière..... | 74 |
| V-4/ Spectre UV-Visible des molécules bioactives..... | 74 |
| V-5/ Essais de séparation et de caractérisation des molécules bioactives produites par les souches actinomycétales 21 et 101..... | 77 |
| V-5-1/ Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des souches actinomycétales 21 et 101..... | 77 |
| V-5-2- Chromatographie sur couche mince de silicagel..... | 77 |
| Conclusion et perspectives..... | 82 |
| Références bibliographiques..... | 85 |
| Annexes..... | 103 |
| Résumés..... | 115 |

Liste des tableaux

| | |
|--|----|
| Tableau N° 1 a : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycetes..... | 15 |
| Tableau N° 1 b : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycetes..... | 16 |
| Tableau N° 1 c : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycetes..... | 17 |
| Tableau N° 1 d : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycetes..... | 18 |
| Tableau N° 2 : Quelques exemples d'antibiotiques antibactériens produits par les actinomycètes..... | 20 |
| Tableau N° 3 : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes..... | 22 |
| Tableau N°4 : Quelques exemples d'extrêmzymes produites par les actinomycètes..... | 26 |
| Tableau N° 5 : Effet inhibiteur de certaines sources de carbone rapidement assimilable sur la biosynthèse d'antibiotiques..... | 28 |
| Tableau N° 6 : Production d'antibiotiques chez les actinomycètes favorisée par les acides aminés..... | 29 |
| Tableau N° 7 : La moyenne des diamètres des zones d'inhibition des souches d'actinomycètes actives pour chaque milieu de culture | 36 |
| Tableau N° 8 : Pourcentage des souches d'actinomycètes actives à activité antibactérienne cultivées sur les dix milieux de culture..... | 37 |
| Tableau N° 9 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture AF..... | 40 |

| | |
|--|----|
| Tableau N° 10 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture Bennett..... | 41 |
| Tableau N° 11 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture CPC..... | 42 |
| Tableau N° 12 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture GBA..... | 44 |
| Tableau N° 13 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture GELM..... | 45 |
| Tableau N° 14 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture GLM..... | 46 |
| Tableau N° 15 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture ISP2..... | 48 |
| Tableau N° 16 : Activité antibactérienne des souches Actinomycetales cultivées sur le milieu de culture NPH..... | 49 |
| Tableau N° 17 : Activité antibactérienne des souches Actinomycetales cultivées sur le milieu de culture PELG..... | 50 |
| Tableau N° 18 : Activité antibactérienne des souches Actinomycetales cultivées sur le milieu de culture SF..... | 51 |
| Tableau N° 19 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 101 en fonction des milieux de culture, le diamètre des cylindres d'Agar, et les bactéries-tests..... | 55 |
| Tableau N° 20 : Récapitulatif des résultats de l'activité antibactérienne en fonction du diamètre des cylindres d'Agar..... | 54 |
| Tableau N° 21 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 21 cultivée sur le milieu de culture PELG, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction de la température..... | 56 |
| Tableau N° 22 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 21 cultivée sur le milieu PELG, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction du pH..... | 57 |
| Tableau N° 23 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 101 cultivée sur le milieu GELM, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction de la température..... | 58 |
| Tableau N° 24 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 101 cultivée sur le milieu GELM, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction du pH..... | 59 |

| | |
|--|----|
| Tableau N°25 : Activité antibactérienne en (mm) des souches actinomycétales 21 et 101 cultivées respectivement sur le milieu de culture PELG et GELM..... | 60 |
| Tableau N° 26 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques bruts des cultures gélosée de la souche 21 sur le milieu PELG, envers les bactéries-tests..... | 64 |
| Tableau N° 27 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques des cultures gélosée de la souche 101 sur le milieu GELM, envers les bactéries-tests..... | 66 |
| Tableau N° 28 : Activité antibactérienne en (mm), des extraits organiques chloroformiques de la souche 21, envers les bactéries-tests, en fonction du pH..... | 67 |
| Tableau N° 29 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche actinomycétale 21, envers les bactéries-tests, en fonction du pH... | 68 |
| Tableau N° 30 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche 101, envers les bactéries-tests, en fonction du pH..... | 70 |
| Tableau N° 31 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques chloroformiques de la souche 21, envers les bactéries-tests, en fonction de la température, l'obscurité et luminosité..... | 71 |
| Tableau N° 32 :Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche 21, envers les bactéries-tests,en fonctionde la température, l'obscurité, et luminosité..... | 72 |
| Tableau N° 33 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche 101, envers les bactéries-tests,en fonctionde la température, l'obscurité, et luminosité..... | 73 |
| Tableau N° 34 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits méthanoliques de la souche 21..... | 77 |
| Tableau N° 35 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits méthanoliques de la souche 101..... | 78 |
| Tableau N° 36 : récapitulatif des résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques E. M. C et E. M. I de la souche actinomycétale 21 et des rapports frontaux des spots révélés..... | 80 |
| Tableau N° 37 : récapitulatif des résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques E. M. I de la souche actinomycétale 101et des rapports frontaux des spots révélés..... | 81 |

| | |
|---|-----|
| Tableau N° 38 : Quelques propriétés physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans notre travail..... | 108 |
|---|-----|

Liste des planches

| | |
|---|-----|
| <p>Planche N° 1 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu AF contre : (a, c et g) <i>Enterococcus sp 43</i>, (b) <i>Staphylococcus aureus 118</i>, (d et h) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>, (e) <i>Serratia marscecens66</i>, (f) <i>Staphylococcus aureus 118</i> par la technique des cylindres d'agar.....</p> | 52 |
| <p>Planche N° 2 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de Bennett contre : (a, b et g) <i>Pseudomonas aeruginosa 13</i>, (c et d) <i>Enterococcus sp 43</i>,(e) <i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>, (f) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>,(h) <i>Staphylococcus aureus 118</i> par la technique des cylindres d'Agar.....</p> | 53 |
| <p>Planche N° 3 : Test d'activité antibactérienne de la souche 21 cultivée sue les milieux gélosés (B) Bennett, (P) PELG et (S) SF contre : (a) <i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>, (b) <i>Pseudomonas aeruginosa 13</i>, (c) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>.....</p> | 61 |
| <p>Plache N° 4 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de la souche 101 envers (a) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>, (b) <i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>et ceux de la souche 21 contre (c) <i>Pseudomonas aeruginosa 13</i>, (d) <i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>.....</p> | 62 |
| <p>Planche N° 5 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu GBA contre : (a, b et f) <i>Enterococcus sp 43</i>, (c)<i>Staphylococcus aureus ATCC 25923</i>, et sur le milieu ISP2 contre (e et g) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i> par la technique des cylindres d'Agar.....</p> | 109 |
| <p>Planche N° 6 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu NPH contre : (a) <i>Staphylococcus aureus 118</i>, (b) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>, (c)<i>Enterococcus sp 43</i> et sur le milieu ISP2 contre : (d, e et f) <i>Pseudomonas aeruginosa 13</i>, (g) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>, (h) <i>Enterococcus sp 43</i>, (i) <i>Staphylococcus aureus 118</i> par la technique des cylindres d'Agar</p> | 110 |
| <p>Planche N° 7 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu PELG contre : (aet c)<i>Pseudomonas aeruginosa 13</i>, (b) <i>Salmonella Heidelberg 1071</i>, (d) <i>Enterococcus sp 43</i>, (e) <i>Staphylococcus aureus 118</i>, (f et h) <i>Serratia marscecens 66</i>, (g) <i>Klebsiella pneumoniae ATCC 700603</i>, réalisé par la technique des cylindres d'Agar...</p> | 111 |

Planche N° 8 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu SF contre : (a) *Pseudomonas aeruginosa* 13, (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (c) *Enterococcus sp* 43, (d et f) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (e) *Serratia marscecens* 66 réalisé par la technique des cylindres d'Agar..... 112

Planche N° 9 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu CPC contre : (a, b et h) *Enterococcus sp* 43, (c) *Staphylococcus aureus* 118, (d, e et f) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (g) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 réalisé par la technique des cylindres d'Agar..... 113

Liste des figures

| | |
|--|----|
| Figure N° 1 : Principaux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane..... | 4 |
| Figure N° 2 : Principaux antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques..... | 4 |
| Figure N° 3 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques..... | 6 |
| Figure N° 4 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates..... | 6 |
| Figure N° 5 : Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i> | 9 |
| Figure N° 6 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés..... | 11 |
| Figure N° 7 : Arbre phylogénétique des actinomycètes..... | 13 |
| Figure N° 8 a : Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses..... | 23 |
| Figure N° 8 b : Secteur angulaire montrant la répartition de production des molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les <i>Streptomyces</i> et genres apparentés, et d'autres genres actinomycétales..... | 24 |
| Figure N° 9 : Diagramme en batons montrant la fréquence des souches actinomycétales actives pour chaque milieu de culture..... | 38 |
| Figure N° 10 : Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche 21 en fonction des solvants et des bactéries-tests..... | 65 |
| Figure N° 11 : Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche 101 en fonction des solvants et des bactéries-tests..... | 65 |
| Figure N° 12 : Spectre UV-Visible des extraits actifs isoamyle acétatiques de la souche 101..... | 75 |
| Figure N° 13 : Spectre UV-Visible des extraits actifs isoamyle acétatiques de la souche 21..... | 76 |
| Figure N° 14 : Spectre UV-Visible des extraits actifs chloroformiques de la souche 21..... | 76 |

Introduction

Introduction

La découverte des premiers agents antibactériens, sulfamides en 1935, puis pénicilline au lendemain de la Seconde Guerre Mondiale, avait suscité le grand espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugelées, révolutionné la médecine moderne et a fortement diminué la souffrance humaine. Malheureusement, leur introduction en médecine humaine fut rapidement suivie par l'apparition de bactéries devenues résistantes (**Courvalin et Philippon, 1990**).

La résistance bactérienne aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent, mais l'émergence de nouvelles maladies infectieuses, la réémergence de maladies infectieuses anciennes, associées à la rapidité et l'intensité croissante des voyages internationaux et du commerce constituent une menace pour la sécurité sanitaire internationale (**Courvalin et Trieu-Cuot, 1990**).

L'utilisation ultérieure d'autres antibiotiques (streptomycine, chloramphénicol, tétracyclines, et érythromycine, par ordre chronologique d'utilisation) fut suivie d'une évolution comparable. En fait, si l'usage de plus en plus répandu des antibiotiques a permis la diminution de la mortalité due aux maladies infectieuses, surtout bactériennes, il n'en a nullement modifié la morbidité. Cet usage fréquemment abusif, est également responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec, pour conséquence, une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques.

Ainsi, l'OMS a adopté, en 2001, une résolution «sécurité sanitaire internationale : alerte et riposte en cas d'épidémie» et a révisé, en 2007, le Règlement Sanitaire International. Il est donc essentiel de reconnaître leur importance, de prendre la mesure de leurs risques, et de mettre en œuvre des politiques adéquates de lutte et de prévention à l'échelon national, régional et international (**Mesbah, 2009**), par la connaissance des mécanismes biochimiques et du support génétiques de la résistance afin de permettre, au plan médical, de guider les choix thérapeutiques et la politique antibiotique (**Courvalin et Philippon, 1990**).

Devant cette émergence de l'antibio résistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé que soit par :

L'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées (**Kitouni, 2007**).

La réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure connue ou la synthèse de nouveaux dérivés (**Kitouni, 2007**).

L'analyse des produits de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques isolées d'écosystèmes peu ou pas explorés (**Kitouni, 2007**).

Pour ces trois approches, les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production d'antibiotiques notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces* dont plus de la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement sont produits par ces bactéries filamenteuses telluriques qui sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par le biais de leur métabolisme secondaire.

Vue leur importance dans la production d'antibiotiques, une collection de souches actinomycétales a été exploitée dans notre travail afin de :

*Sélectionner des souches actinomycétales productrices d'antibactériens par leur mise en culture sur différents milieux de culture et la mise en évidence de leurs activités antibactériennes par la technique des cylindres d'agar envers 9 bactéries-tests.

*Choisir le meilleur milieu de culture pour la production d'antibactériens.

*Etudier l'effet du diamètre des cylindres d'Agar sur les résultats de l'activité antibactérienne.

*Etudier l'effet du pH du milieu de culture et celui de la température d'incubation sur le métabolisme des antibiotiques des souches actinomycétales criblées au préalable.

*Extraire ces molécules bioactives par une batterie de solvants organiques à polarité différente, et leurs identifications grâce à des techniques spectrophotométriques UV- Visible, physico-chimiques, ainsi que celles de la chromatographie sur couche mince de silicagel GF₂₅₄.

— *Revue Bibliographique*

I/ Les infections bactériennes et antibiothérapie

Les systèmes de santé, dans le monde en générale et en Algérie en particulier continuent d'être confrontés à de nouveaux défis et le plus important d'entre eux est celui des maladies infectieuses.

En effet, les maladies infectieuses, censées être vaincues par le progrès en matière d'hygiène, les succès réels dans le domaine de la prévention et des traitements antibiotiques, le développement des vaccins et l'amélioration des conditions de vie en général, demeurent la principale cause de mortalité dans le monde selon l'OMS avec 14,7 millions de morts en 2001 soit 26 % de la mortalité mondiale.

Elle comporte un risque de prolifération rapide, d'émergence ou de réémergence du fait principalement des changements environnementaux et sociaux associés à la rapidité, la facilité et à l'intensité accrue des transports internationaux qui favorisent la dissémination rapide des phénomènes épidémiques.

L'émergence des résistances aux médicaments anti-infectieux se développe en raison de leur pression de sélection mais aussi de leur mauvaise utilisation. Enfin, les maladies infectieuses se caractérisent par des disparités, souvent importantes, entre les pays dans l'élaboration et la mise en œuvre des stratégies de lutte.

Il est donc essentiel de reconnaître leur importance, de prendre la mesure de leurs risques, et de mettre en œuvre des politiques adéquates de lutte et de prévention à l'échelon national, régionale et internationale (**Mesbah, 2009**).

I-1/ Situation épidémiologique en Algérie

L'Algérie, aujourd'hui, poursuit sa phase de transition épidémiologique qui est marquée depuis deux décennies par la persistance de certaines maladies transmissibles avec des bouffées épidémiques (fièvre typhoïde, brucellose), par la résurgence sous forme d'une flambée épidémique de maladies infectieuses telles la diphtérie, la rougeole et même de maladies devenues rarissime comme le botulisme en 1998, et la peste en 2003. Cette situation illustre l'importance du défi auquel l'Algérie est confrontée (**Mesbah, 2009**).

I-2/ Antibiothérapie

Quand les défenses naturelles du corps ne peuvent empêcher la maladie ni la vaincre, on a recours à la chimiothérapie (**Tortora et al., 2003**).

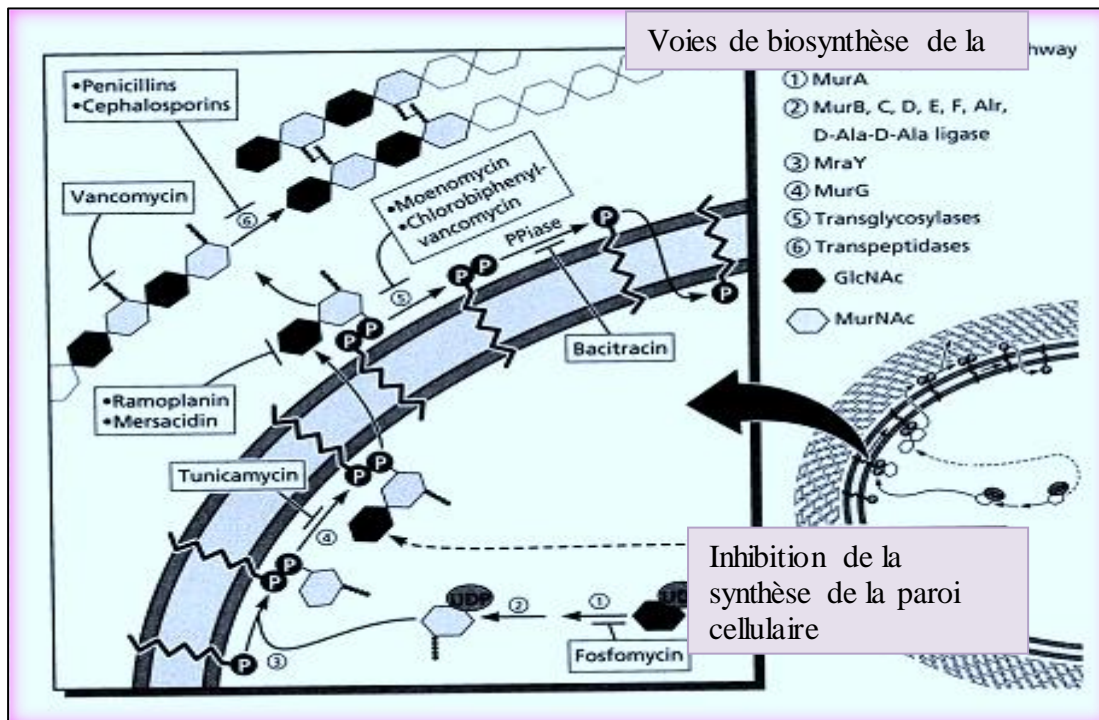


Figure N° 1 : Principaux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane (Walsh *et al.*, 2001)

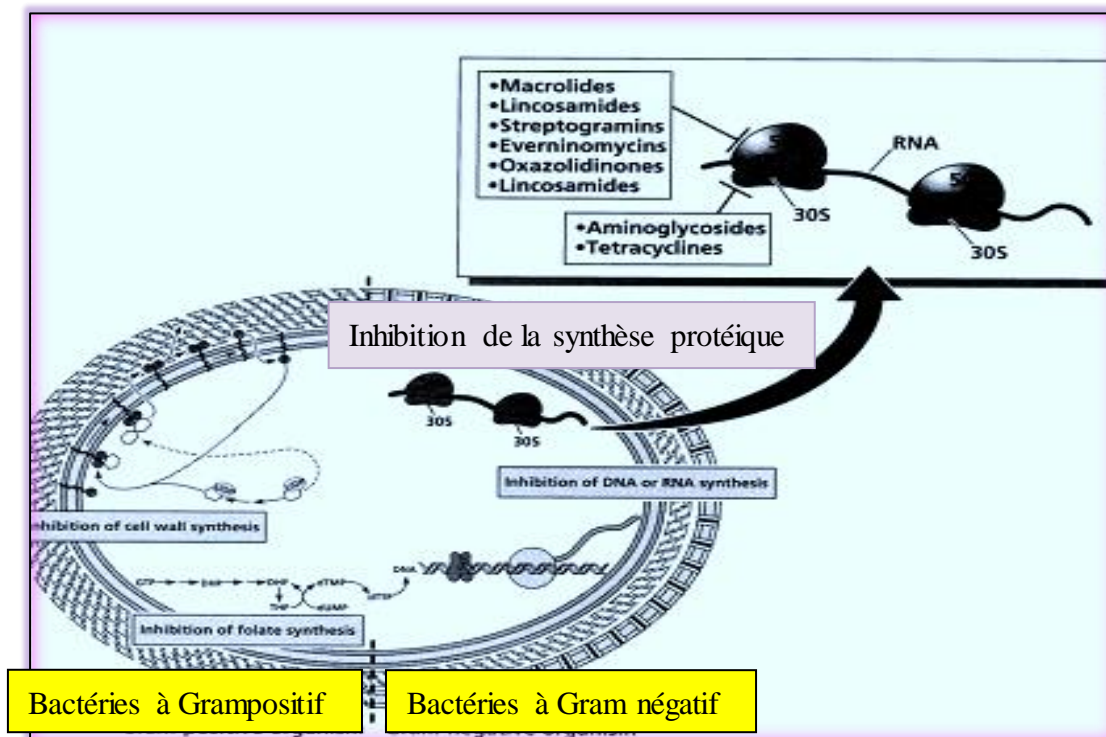


Figure N° 2 : Principaux antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques (Walsh *et al.*, 2001)

I-2-1/ Définition des antibiotiques

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

I-2-2/ Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme et le spectre d'action (Yala *et al.*, 2001).

La sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques est très diverse, les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative peuvent avoir un comportement différent vis-à-vis un antibiotique spécifique, alors que certains antibiotiques à large spectre présentent la même efficacité sur ces deux groupes (Madigan *et al.*, 1997).

Théoriquement, les agents antimicrobiens visent la destruction des agents agresseurs en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique, ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et leurs fonctions (figures N°1, 2, 3, 4) (Tortora *et al.*, 2003).

I-2-3/ Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est un phénomène aussi ancien que l'apparition des antibiotiques. Les antibiotiques sont au départ des substances naturelles générées par des champignons mais aussi par certaines bactéries pour se défendre contre les autres bactéries.

I-2-3-1/ Les types de résistance

I-2-3-1-1/ La résistance naturelle.

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développé dans le même temps, les moyens de s'en protéger. Il s'agit de la résistance naturelle aux antibiotiques (Lozniewskiet Rabaud, 2010).

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (Smaoui, 2010), elle fait partie du patrimoine génétique normale du germe (Yala *et al.*, 2001). *Klebsiella spp* produit naturellement des bêta-lactamases, et les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (Lozniewski et Rabaud, 2010).

I-2-3-1-2/ La résistance acquise

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

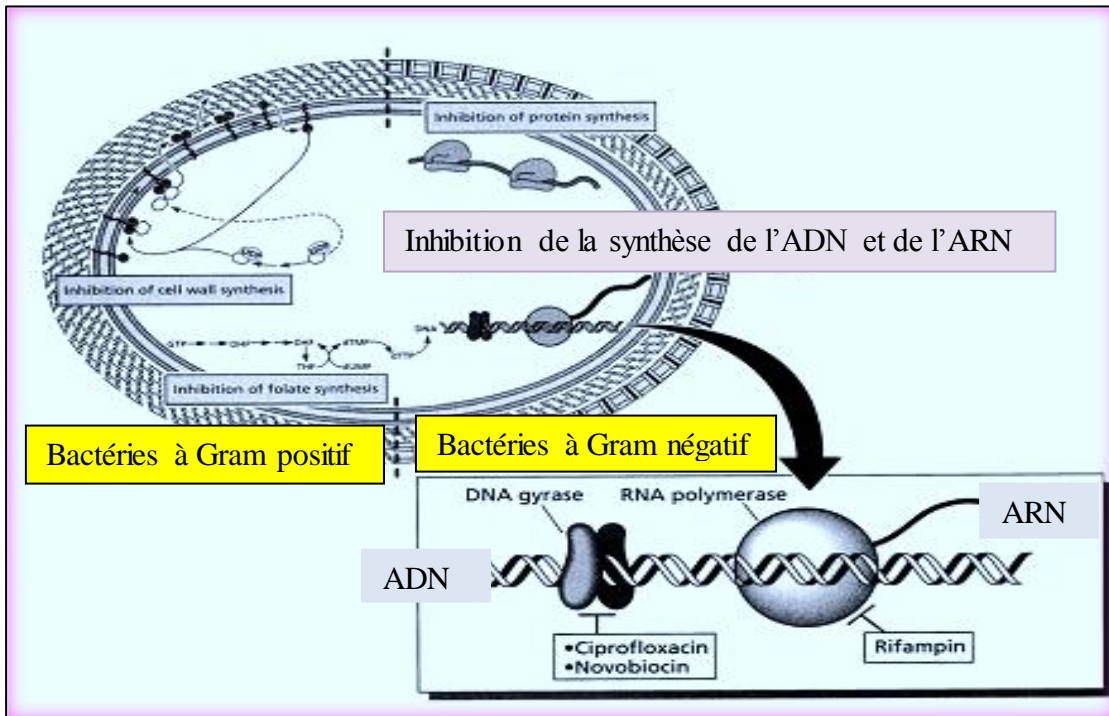


Figure N° 3 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Walsh *et al.*, 2001)

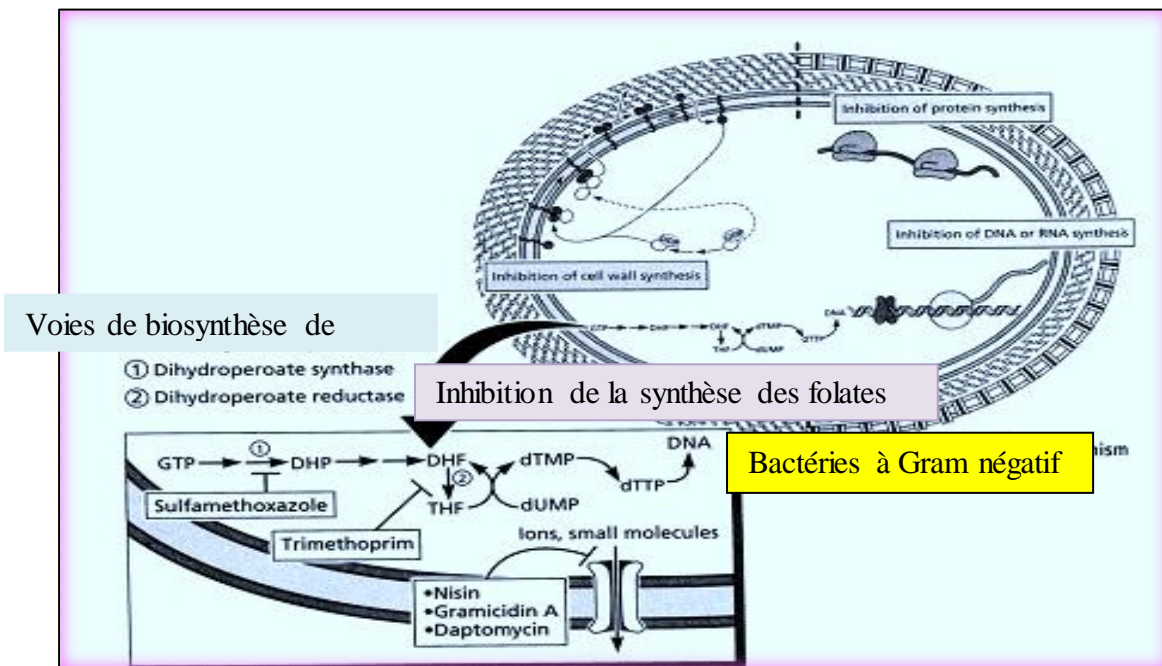


Figure N° 4 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates (Walsh *et al.*, 2001)

d'antibiotiques, ces nouveaux gènes peuvent être obtenus soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (**Yala et al., 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007**).

I-2-3-2/ Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux agents antibactériens

Ils peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes : diminution de la perméabilité et efflux actif, modification de la cible des antibiotiques, production d'enzymes inactivant les antibiotiques (**Levy et Marshall, 2004 ; Wright, 2007**).

I-2-3-2-1/ Diminution de la perméabilité par mutation affectant la structure des porines ou diminuant leur synthèse par lesquelles l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie (**Lozniewski et Rabaud, 2010**).

I-2-3-2-2/ Expulsion rapide de l'agent hors de la cellule avant qu'il puisse agir

Un certain nombre de bactéries possède une capacité intrinsèque de rejeter hors de la cellule la substance qui vient d'y entrer. Cette propriété est très connue chez les bactéries à Gram négatif (c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*) qui possèdent dans leur membrane des protéines, appelées pompes effluentes, qui expulsent les antibiotiques (**Lee, 2006 ; Jayaraman, 2009**).

I-2-3-2-3/ La destruction ou l'inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes

Les antibiotiques sont susceptibles d'être dégradés par voie enzymatique. L'exemple le plus connu est l'hydrolyse du noyau bêta-lactame par des bêta-lactamases dont certaines de ces enzymes sont à spectre élargi (**Braford, 2001**).

Le nombre de bêta-lactamases plasmidiques est très élevé et elles sont classées selon leurs vitesses d'hydrolyse, leurs constantes d'affinité pour les bêta-lactamines, leur faculté à être inhibée par les inhibiteurs tels que l'acide clavulanique (**Lozniewski et Rabaud, 2010**).

***Les pénicillinases sensu stricto** ; chez les espèces *Staphylococcus aureus*, elles inactivent la pénicilline G, la pénicilline A, elles sont par contre sans action sur la pénicilline M ainsi que sur les céphalosporines.

***Les pénicillinases à spectre élargi** ; Ces bêta-lactamases entraînent une résistance (ou une diminution d'activité) vis-à-vis des pénicillines G, des pénicillines M, des carboxypénicillines, des uréidopénicillines, des céphalosporines de la 1^{ère} et de la 2^{ème} génération.

***Les Béta-Lactamases à Spectre Étendu (BLSE)** ; ces bêta-lactamases dérivent des enzymes précédentes par mutation des gènes codant pour les bêta-lactamases à spectre élargi. Le profil de résistance conféré est identique à celui conféré par les bêta-lactamases à spectre élargi mais il s'étend aux céphalosporines de la 3^{ème} génération et à l'aztréonam. Les bêta-lactamases à spectre étendu sont sensibles aux inhibiteurs (**Bonnet, 2004**).

***Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs** ; les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs dérivent de certains bêta-lactamases à spectre élargi par mutation ponctuelle. Le profil conféré est identique à celui des bêta-lactamases à spectre élargi mais ces enzymes ne sont pas inhibées par l'acide clavulanique, le sulbactam ou le tazobactam.

D'autres enzymes hydrolysent de nombreux antibiotiques, tels céphotaximases (**Bonnet, 2004 ; Conton et Coque, 2006**). Les enzymes inactivant les aminosides sont divisées en trois classes : aminosides-phosphotransférases, aminosides-nucléotidyltransférases, aminoacétyltransférases (**Doi et Arakawa, 2007**).

Les streptogramines sont inhibés par streptogramine A (O-) acétyltransférase (**Seoane et Garcia-Lobo, 2000 ; Suanito et Roderick, 2002**) et streptogramines B (CO-) lyase (**Mukhtar et al., 2001**).

II/- Les actinomycètes. Généralités

II-1/ Caractéristiques morphologiques des actinomycètes

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

Les actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs, du fait de leur mycélium, souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif, du fait également de la fructification par sporanges libérant des spores chez nombre d'entre eux (**Hasley et Leclerc, 1993 ; Horinouchi, 2002**).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, et immunologiques les rangent parmi les procaryotes. Leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives), et leur cytologie est celle des bactéries (**Mariat et Sebald, 1990**). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (leur parasitage par des bactériophages, leur sensibilité aux antibiotiques antibactériens) ne permet pas de les classer parmi les mycètes (**Hasley et Leclerc, 1993**).

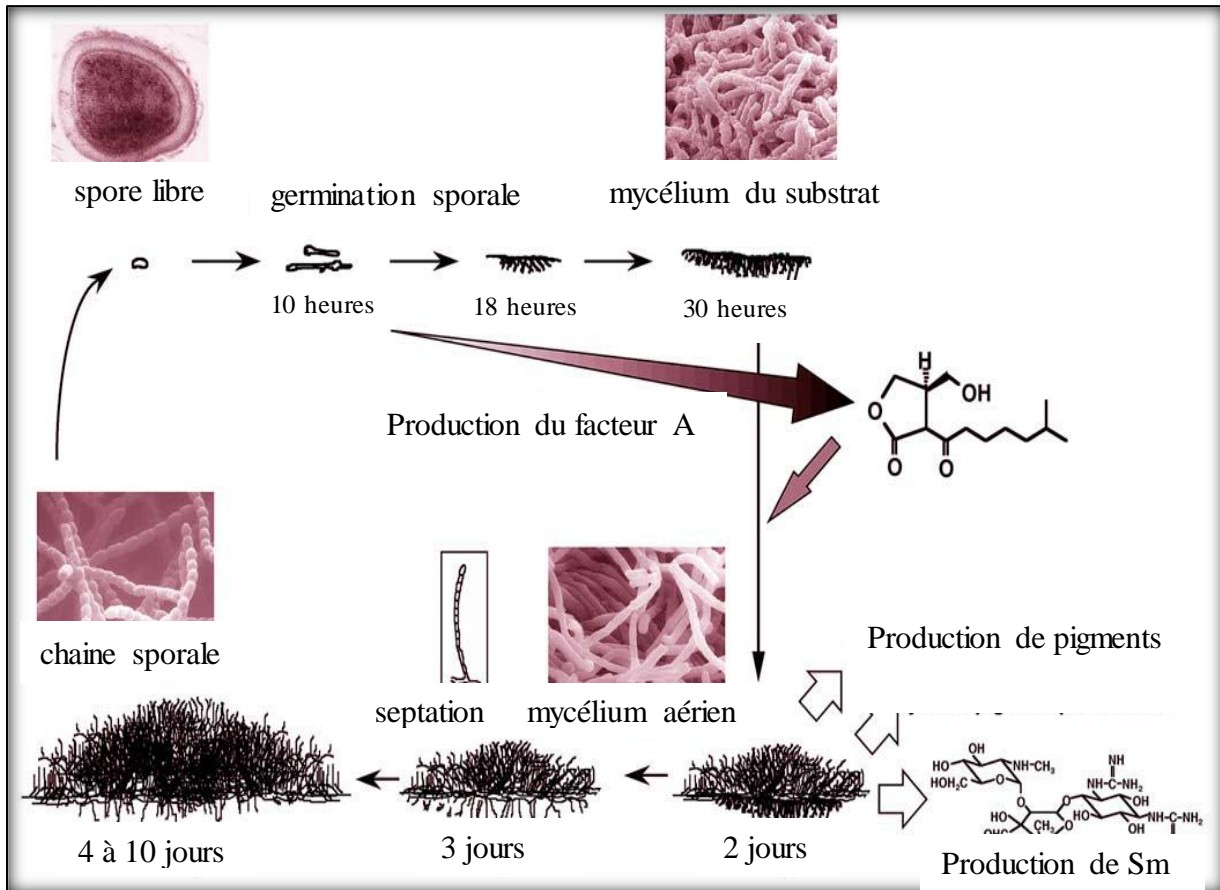


Figure N° 5 : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002)

II-2/ Classification des actinomycètes

Les actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria, contenant l'ordre des Actinomycetales (**Larpen, 2000**). La classe des Actinobacteria se présente comme suit :

Classe Actinobacteria

| Sous-classe | Ordre | Famille |
|-------------------|-------------------|--------------------|
| Acidimicrobidae | Acidimicrobiales | Acidimicrobiaceae |
| Rubrobacteridae | Rubrobactérales | Rubrobacteraceae |
| Coriobacteridae | Coriobactérales | Coriobacteriaceae |
| Sphaerobacteridae | Sphaerobactérales | Sphaerobacteraceae |
| Actinobacteridae | Actinobactérales | |

II-3/ Le cycle de développement des actinomycètes (exemple type : *Streptomyces spp*)

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées comme le montre la figure N° 5 (**Flårdh et Bruttner, 2009**).

Il a été estimé qu'environ 60 % des *Streptomyces* produisent, pendant la phase de limitations nutritionnelles, une famille de protéines du type γ - butyrolactone (**Saffroy, 2006**). Ces protéines constituent des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques (**Demain et Dijkhuizen, 2006**).

II-4/ Mycélium du substrat et mycélium aérien des actinomycètes

Lorsqu'il croît sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphes formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former un mycélium végétatif (**Prescott et al., 2003**).

Les sporoactinomycètes produisent un véritable mycélium du substrat, ramifié et non fragmenté. Des parois transversales peuvent être formées pour isoler les parties les plus âgées du mycélium. Des spores sont formées sur le mycélium du substrat chez des genres comme : *Micromonospora*, *Micropolyspora*, et parfois *Streptomyces* (**Saffroy, 2006**).

Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat (figure N° 6). Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins

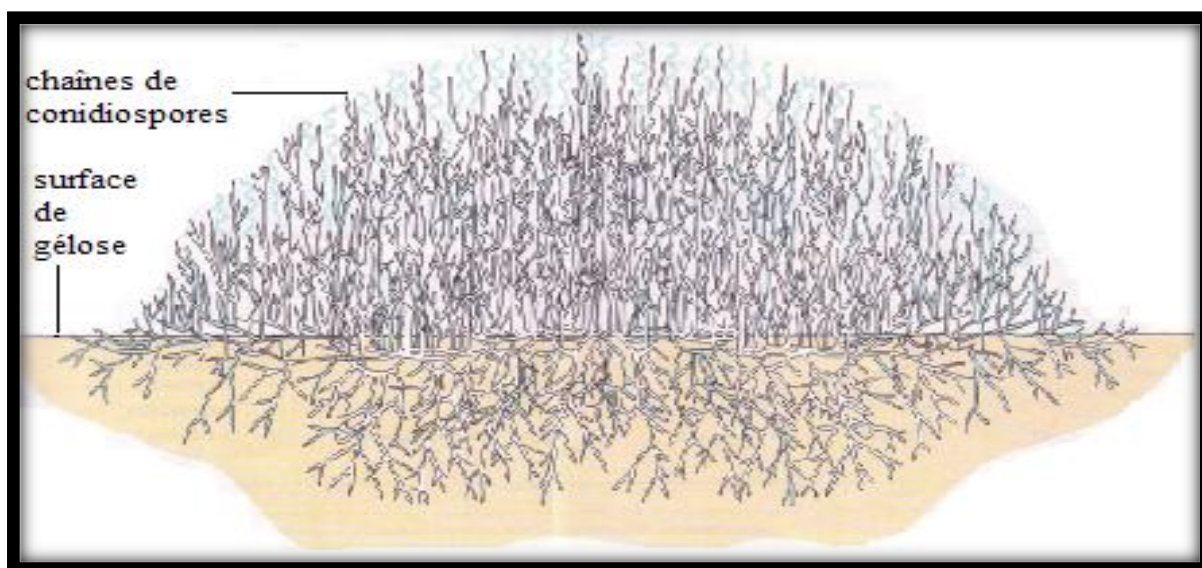


Figure N° 6 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (**Prescott *et al.*, 2003**)

ramifiés que les hyphes du substrat, ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe (Prescott *et al.*, 2003).

II-5/ Formation des spores par les actinomycètes

Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores (Theilleux, 1993), ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Saffroy, 2006).

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

Les spores de *Streptomyces* sont métaboliquement moins actives que les hyphes végétatifs, bien qu'elles ne soient pas complètement en dormance. Chez les actinomycètes *Actinoplanes* et *Pilimelia*, des zoospores mobiles (pourvues de flagelles) se forment à l'intérieur d'un sac fermé appelé sporange, les endospores sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphes existant (Singleton, 1994), elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces* (Pelmont, 1994).

II-6/ Le matériel génétique des actinomycètes

Le matériel génétique des actinomycètes est constitué par l'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par l'ADN plasmidique ou de l'ADN phagique. Un caractère majeur est la proportion élevée environ 70 % de guanine et cytosine (G+C) dans l'ADN de la plupart des actinomycètes (Theilleux, 1993).

II-7/ L'identification des actinomycètes

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

La taxonomie des actinomycètes fut marquée par quatre périodes essentielles dont chacune a apporté de nouveaux critères de classification.

Durant la première période, seuls les critères macro et micro morphologiques (mycélium fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycéliums, production de spores, etc) permettaient de différencier les genres entre eux. Ceci a donné lieu à la création de

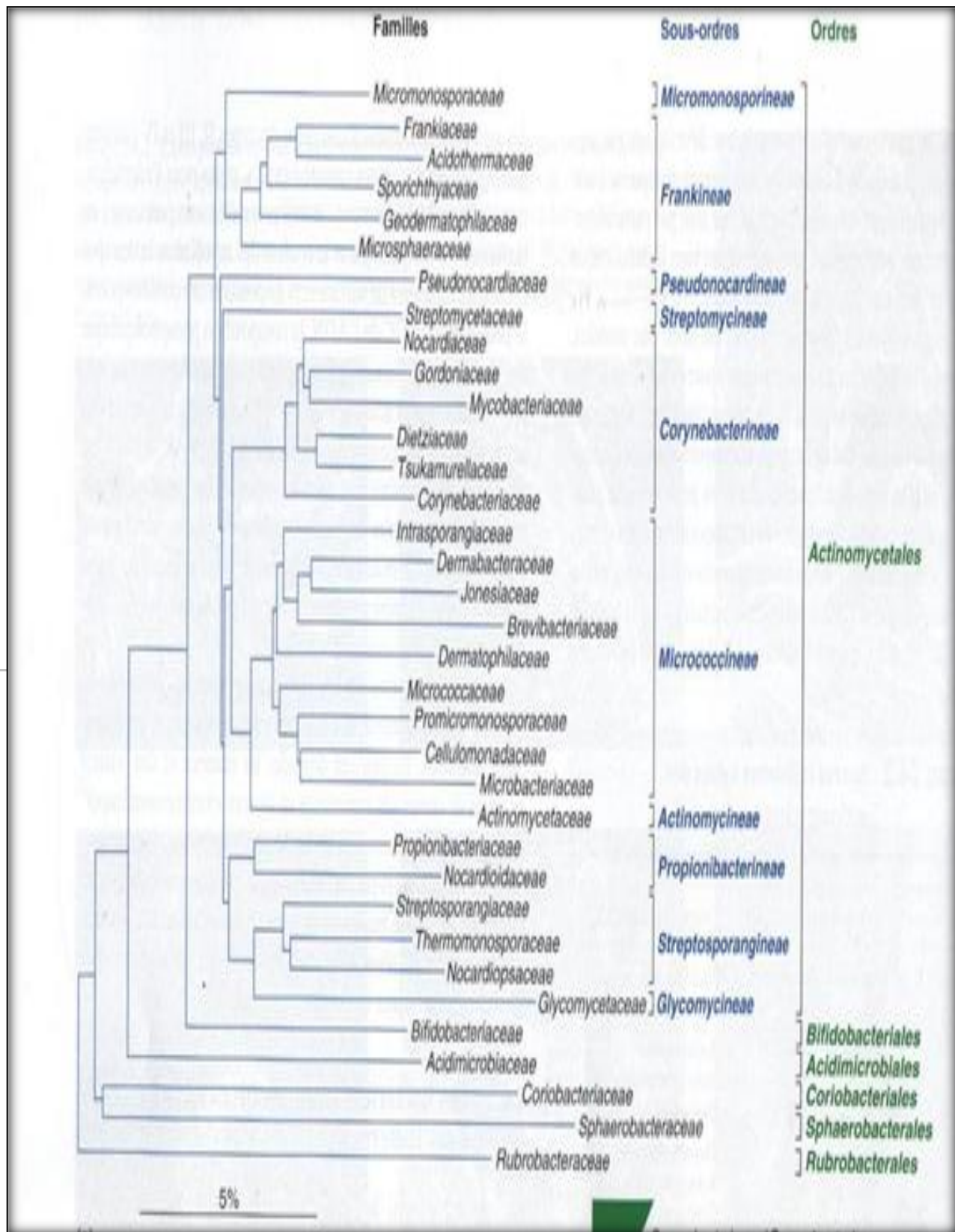


Figure N° 7 : Arbre phylogénétique des actinomycètes (Prescott *et al.*, 2003)

nombreux genres dont les limites entre eux n'étaient pas toujours nettes, ce qui a engendré beaucoup de confusion (**Waksman, 1943**).

La seconde période voit l'utilisation de la chimiotaxonomie basée sur la composition cellulaire en acides aminés (**Becker et al., 1964**), en sucres (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**), en acides mycoliques (lipides pariétaux complexes et insaturés), en phospholipides membranaires (**Lechevalier et al., 1977**; **Minnikin et al., 1977**) et en ménaquinones membranaires. Les tableaux 1a, 1b, 1c, et 1d présentent quelques critères morphologiques et chimiques d'identification des actinomycètes.

La troisième période qui a débuté dans les années 70 et a trouvé son apogée entre 1980 et 1990, combine l'outil informatique à de nombreux tests physiologiques pour différencier les espèces de chaque genre entre elles. Ainsi, est née la taxonomie numérique avec l'obtention de dendrogrammes (figure N° 7) qui ont permis d'apporter beaucoup de clarté au niveau de la composition en espèces des genres *Rhodococcus*, *Nocardia*, et *Streptomyces* (**Williams et al., 1993**), *Actinomadura* (**Athalye et al., 1985**), *Nocardiopsis*, et *Actinoplanes* (**Goodfellow, 1971**).

La quatrième période a débuté durant les années 80 et s'étend jusqu'à l'heure actuelle. Elle consiste en l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ARN ribosomique 16 S, qui ont permis de tracer toute la phylogénie des actinomycètes

Grâce au séquençage de l'ARN 16 S, certains genres bactériens non mycéliens furent inclus dans l'ordre des Actinomycetales, tandis que d'autres en furent exclus (**Stackbrandt et Geobel, 1994**).

II-8/ Métabolisme des actinomycètes

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

Ces bactéries sont aérobies, mésophiles, leur température optimale est de 25-30 °C, leur pH optimal est de 6,5-8 (**Guiraud, 1998**).

Les actinomycètes sont généralement hétérotrophes, certains étant chimio-autotrophes, ils peuvent utiliser une grande variété de substances comme sources de carbone et d'azote tels la chitine, la kératine, la cellulose, le xylane, le plastique, le nitrate, les polluants pétroliers comme

Tableau N° 1 a : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycètes (**Larpent, 2000**)

| Acides aminés | Sucres | Critères morphologiques | Genres et groupes |
|---|------------------|--|--|
| Pas de DAP | | Mycélium rampant seul | <i>Oerskovia</i> |
| | | Dissociation en éléments mobiles Mycélium aérien stérile Dissociation en éléments immobiles Sporange avec spores mobiles Courtes chaînes de conidies sur mycélium aérien | <i>Promicromonospora</i> <i>Actinoplanes</i> <i>Actinomadura</i> |
| L-DAP | Xylose /Madurose | Mycélium aérien et rampant se dissociant en fragments | <i>Nocardioides</i> |
| | | Mycélium rampant seul portant des vésicules terminales ou sub terminales | <i>Intrasporangium</i> |
| | | Mycélium aérien avec longues chaînes de spores | <i>Streptomyces</i> <i>Kitasatosporia</i> |
| | | Sclérote | <i>Streptomyces</i> |
| | | Très courtes chaînes de larges conidies sur le mycélium végétatif et aérien | <i>Streptomyces</i> |
| | | Verticille de chaînettes de spores | <i>Streptoverticillium</i> |
| Pas de mycélium aérien, sporanges sur le mycélium végétatif | | <i>Kineosporia</i> | |

Tableau N° 1b : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycètes (Larpent, 2000)

| Acides aminés | Sucres | Critères morphologiques | Genres et groupes |
|---------------|---|---|--------------------------|
| m-DAP | Xylose + Arabinose | Pas de sporanges ; conidies isolées sur le mycélium végétatif | <i>Micromonospora</i> |
| | | Pas de sporanges, courtes chaînes de conidies | <i>Cattellatospora</i> |
| | | Chaînes de conidies sur mycélium aérien | <i>Glycomyces</i> |
| | | Sporanges oligosporiques, dactyloïdes. Spores mobile | <i>Dactylosporangium</i> |
| | | Sporanges avec spores sphériques, mobiles | <i>Actinoplanes</i> |
| | | Sporanges avec spores mobiles en bâtonnets | <i>Ampullariella</i> |
| | | Sporanges, spores avec flagelles latéraux | <i>Pilimelia</i> |
| | Sporanges multiloculaires, spores immobiles | <i>Frankia</i> | |
| | Madurose | Courtes chaînettes de conidies sur mycélium aérien, incurvées en crosse | <i>Actinomadura</i> |
| | | Chaînes de conidies avec de spores | <i>Microbispora</i> |
| | | Chaînes de conidies avec 2-6 spores | <i>Microtetraspora</i> |
| | | Sporanges avec 2 spores mobiles | <i>Planobispora</i> |
| | | Sporange avec 1 spore mobile | <i>Planomonospora</i> |
| | | Sporanges sphériques sur mycélium contenant de nombreuses spores mobiles en bâtonnets | <i>Spirillospora</i> |

Tableau N° 1 c : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycetes (Larpent, 2000)

| Acides aminés | Sucres | Critères morphologiques | Genres et groupes |
|---------------|----------------------------------|--|---------------------------|
| m-DAP | Fucose | Sporanges multiloculaires | <i>Frankia</i> |
| | Rhamnose galactose | Sporanges avec spores mobiles | <i>Actinoplanes</i> |
| | Rhamnose Galactose Mannose | Hyphes rampantes et aériennes se fragmentant en éléments immobiles | <i>Saccharothrix</i> |
| | Galactose | Morphologie comparable à <i>Streptomyces</i> | <i>Streptoalloteichus</i> |
| | | Morphologie comparable à <i>Streptomyces</i> | <i>Kitasatospora</i> |
| | | Acide nocardiomycologique (NMA) Mycélium rampant fucage | <i>Nocardia</i> |
| | | Acide nocardiomycologique présent, thalle rose saumon | <i>Rhodococcus</i> |
| | Arabinose Galactose | Acide nocardiomycologique présent, mycélium rampant dissocié en batonnets | <i>Tsukamurella</i> |
| | | Acide nocardiomycologique présent, spores par 2 sur mycélium rampant, mycélium aérien épars | <i>Actinobispora</i> |
| | | Acide nocardiomycologique absent, spores longues, cylindriques sur mycélium aérien, formées par bourgeonnement | <i>Pseudonocardia</i> |

Tableau N° 1 d : Critères chimiques et morphologiques d'identification des Actinomycetes (Larpent, 2000)

| Acides aminés | Sucres | Critères morphologiques | Genres et groupes |
|---------------|------------------------|--|--|
| m-DAP | Arabinose Galactose | Acide nocardiomycologique absent, très longues chaînes de conidies sur mycélium aérien | <i>Saccharomonospora</i> |
| | | Acide nocardiomycologique absent, longues chaînes de conidies sur mycélium aérien, halophile | <i>Actinopolyspora</i> |
| | | Acide nocardiomycologique absent, mycélium rampant se dissocie en éléments mobiles comme les hyphes aériens | <i>Amycolata</i> <i>Amycolatopsis</i> |
| | | Acide nocardiomycologique absent, mycélium aérien avec hyphes enroulées dans matrice amorphe | <i>Kibdelosporangium</i> |
| | | Acide nocardiomycologique absent, longues chaînes de spores sur mycélium aérien et rampant. Spores mobiles | <i>Akimokineospora</i> |
| | | Acide nocardiomycologique absent, mycélium aérien se fragmente en bâtonnet et cocci, courtes chaînes de spores | <i>Pseudoamycolata</i> |
| | | Conidies isolées non thermorésistantes | <i>Thermonospora</i> |
| | | Longues chaînes de spores sur mycélium aérien | <i>Nocardiotopsis</i> |
| | | Hyphes aériennes en synnema, spores mobiles | <i>Actinosynnema</i> |
| | | Sporanges multiloculaires avec spores mobiles | <i>Geodermatophilus</i> |

le benzène, polychloro-bisphényl, la gélatine, le xylénol, la caséine, l'urée, les pesticides comme l'atrazine (Mariat et Sebald, 1990 ; Korkmaz *et al.*, 2003 ; Kang et Kondo, 2004 ; Oulmi, 2004 ; Pelmont, 2005 ; Kitouni, 2007 ; Jaradat *et al.*, 2008 ; Hernandez *et al.*, 2008 ; Khan *et al.*, 2008 ; Zerman, 2008 ; Mane *et al.*, 2009 ; Aboul-Enein *et al.*, 2010).

Les actinomycètes notamment le genre *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires tels que : l'acide indolacétique (Khamna *et al.*, 2010), les toxines, les pigments, et les antibiotiques.

II-9/ Distribution des actinomycètes dans la nature et pathogénéicité

Cette grande diversité métabolique leur permet d'avoir une importance écologique majeure dans l'environnement (Hasley et Leclerc, 1993). Les actinomycètes sont des micro-organismes très ubiquitaires, que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants. Dans le sol, les actinomycètes représentent 10 à 20 % de la population microbienne totale (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Takahashi et Omura, 2003).

Les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à climat aride, se sont révélés riche en actinomycètes parfois réputés rares de par le monde (Boudemagh, 2007). On les trouvenon seulement dans les horizons de surface, mais aussi à plus de 2 mètres de profondeur et en quantité appréciable (Sabaou *et al.*, 1998).

Des actinomycètes ont été isolés à partir d'habitat variés, tels que les rhizosphères des plantes médicinales (Khamna *et al.*, 2010), de l'écorce d'arbres (Pullen *et al.*, 2002 ; Kitouni *et al.*, 2005), des sédiments marins (Balagurunthan *et al.*, 2010). Certaines espèces ont, en outre, été isolées à partir de milieux extrêmes : des sols pollués contenant des métaux (Desjardin, 2002), des hydrocarbures ou du pétrole (Baniyadi *et al.*, 2009), les boues activées (Simon et Meunier, 1970), d'autres se comportent comme des parasites intracellulaires des spongiaires (Grandhimathi *et al.*, 2007).

Dans les réseaux, en l'absence de possibilité de photosynthèse, les actinomycètes peuvent générer la géosmine, et provoquer l'apparition de goûts et d'odeur de moisi (Leveau, 1993).

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport (Gazengo *et al.*, 1998, Reponen *et al.*, 1998). Les spores d'actinomycètes thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air et leur dissémination se fait facilement grâce au mouvement de l'air (Mazodier, 1974), c'est le cas des spores de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis* qui ne se détruisent qu'à une température de 130 °C, le traitement à 120 °C inhibe seulement leur germination (Boudemagh, 2006).

Tableau N° 2 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes

| Actinomycètes producteurs | Antibiotiques | Références |
|---|----------------------------------|---------------------------------------|
| 1/Les agents antibactériens | | |
| <i>Micromonospora sp.</i> | Clostomycine | Takahashi <i>et al.</i>, 2003 |
| <i>Streptomyces griseus</i> | Candicidine | Jinenez <i>et al.</i>, 2009 |
| <i>Streptomyces lydicus</i> | Streptolydigne | Liuet <i>al.</i>, 2007 |
| <i>Streptomyce lindensis</i> | Rétamycine | Inoue <i>et al.</i>, 2007 |
| <i>Marinispora sp.</i> | Marinomycine | Sturdikovà et Sturdik, 2009 |
| <i>Verrucosispora sp.</i> | Abyssomycine | Sturdikovà et Sturdik, 2009 |
| 2/ Les agents antifongiques | | |
| <i>Streptomyces griseochromogenes</i> | Blasticidine | Fukunaga <i>et al.</i>, 2008 |
| <i>Streptomyces humidus</i> | Phenylacétate | Hwang <i>et al.</i>, 2001 |
| <i>Nocardia transvalensis</i> | Transvalencine | Mukai <i>et al.</i>, 2006 |
| <i>Streptomyces nodosus</i> | Amphotéricine B | Carle <i>et al.</i>, 2003 |
| 3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes | | |
| Spinosad. Insecticide neurotoxique | <i>Saccharopolyspora spinosa</i> | Williamson <i>et al.</i>, 2006 |
| Herbicides. Exemple 1. 2,4-Dihydro-4-(β -D-ribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one | <i>Actinomadura sp</i> | Schmitzer <i>et al.</i>, 2000 |
| Exemple 2. Herbimycine | <i>Streptomyces hygrosopicus</i> | Omura <i>et al.</i>, 2006 |

Les spores des genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, ou thermotolérants tels que *Pseudonocardia*, *Microbispora*, etc., sont également résistantes à des températures élevées (**Boudemagh, 2006**).

Dans la distribution naturelle des actinomycètes, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'Homme pour lesquels certaines espèces sont pathogènes (**Theilleux, 1993**). Peu de maladies des plantes sont provoquées par les actinomycètes. Notons une gale de pomme de terre causée par *Streptomyces scabiei* (**Neeno-Eckwall et al., 2001**).

Les actinomycètes sont importants en raison des maladies humaines et animales que certains provoquent, ils peuvent occasionner certaines tumeurs (mycétomes) chez l'Homme (**Noyal et al., 2010**). Durant les dix années (1995 - 2005), deux cas de mycétomes à *Actinomadura madurae* et à *Streptomyces* ont été observés chez deux patientes originaires de Tamanrasset et d'Ain defla en Algérie (**Zait et al., 2008**).

Certaines Mycobactéries sont la cause de pathologies animales, végétales et surtout humaines, comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la Tuberculose) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) (**Bousseboua, 2005**).

II-10/ Substances bioactives produites par les actinomycètes

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

II-10-1/ Les antibiotiques

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part dominante dans l'industrie pharmaceutique, représentant près de 25% de son chiffre d'affaire.

Les tableaux N° 2 et 3 illustrent quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les actinomycètes.

En ce qui concerne l'activité antifongique des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (**Sanasam et Ningthoujam, 2010**), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophyton rubrum* (**Lakshmipathy et Krishnan, 2009**).

Tableau N° 3 : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes

| Molécules bioactives | Actinomycète producteur | Références |
|---|--------------------------------------|-----------------------------------|
| 1/ Les agents anti parasitaires | | |
| Trioxacarcine | <i>Streptomyces sp</i> | Maskey et al., 2004 |
| Prodiginine | <i>Streptomyces coelicolor</i> | Williamson et al., 2006 |
| 2/ Les agents anti viraux | | |
| 9-β-D-arabinofuranosyladénine | <i>Streptomyces antibioticus</i> | Madigan et al., 1997 |
| Panosialine | <i>Streptomyces sp</i> | Aoyagi et al., 2006 |
| 3/ L' agent hypocholestérolémique | | |
| Rapamycine | <i>Streptomyces hygroscopicus</i> | Chen et al., 1999 |
| 4/ Les agents anti tumoraux | | |
| Asterobactine | <i>Nocardia asteroides</i> | Nemoto et al., 2002 |
| Salinosporamide A | <i>Salinispora tropica</i> | Fenical et al., 2006 |
| Mechercharmycine | <i>Thermoactinomyces sp</i> | Kanoh et al., 2005 |
| Marinomycine | <i>Marinospora sp</i> | Kwon et al., 2006 |
| Borrelidine | <i>Streptomyces sp</i> | Vino et Lokesh, 2008 |
| IB-00208 | <i>Actinomadura sp</i> | Malet-Cascon et al., 2009 |
| 5/ Les agents immunostimulateurs | | |
| Rubratin | <i>Nocardia rubra</i> | De boer et al., 2000 |
| Bestatine | <i>Streptomyces olivoreticuli</i> | Ichinose et al., 2003 |
| FR-900494 | <i>Kitasatospora kifunense</i> | Iwami et al., 2006 |
| 6/ Les agents immunosuppresseurs | | |
| Pentalenolactone | <i>Streptomyces filipinensis</i> | Uyeda et al., 2001 |
| Brasilicardine A | <i>Nocardia brasiliensis</i> | Komatsu et al., 2005 |
| 7/ Les enzymes à application thérapeutique (anti-tumorale) | | |
| L- asparaginase | <i>Streptomyces spp</i> | Saleem Basha et al., 2009 |
| L- glutaminase | <i>Streptomyces olivochromogenes</i> | Balagurunatha et al., 2010 |

Les figures N° 8 *a* et 8 *b* représentent respectivement la répartition de production d'antibiotiques entre les bactéries et les champignons, et celles des molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et autres genres d'actinomycètes dont la dominance de production est affectée aux bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

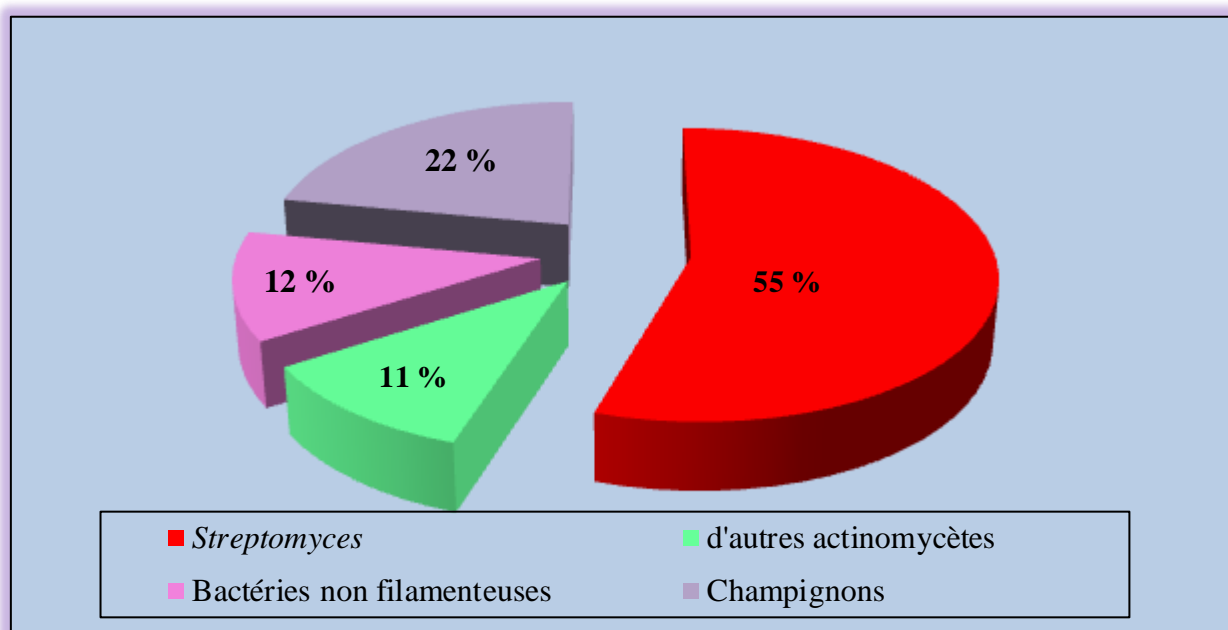


Figure N° 8 a: Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (**Berdy, 2005**)

II-10-2/ Les extremozymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes. Ces enzymes peuvent avoir des applications médicales, en Biologie moléculaire, en industrie alimentaire ou celle des détergents, ...etc.

Les enzymes isolées à partir des actinomycètes des environnements extrêmes, dites actinomycètes extrêmophiles, sont commercialement très importantes. Quelques exemples d'extrémozymes produites par les actinomycètes extrêmophiles sont résumés dans le tableau N° 4.

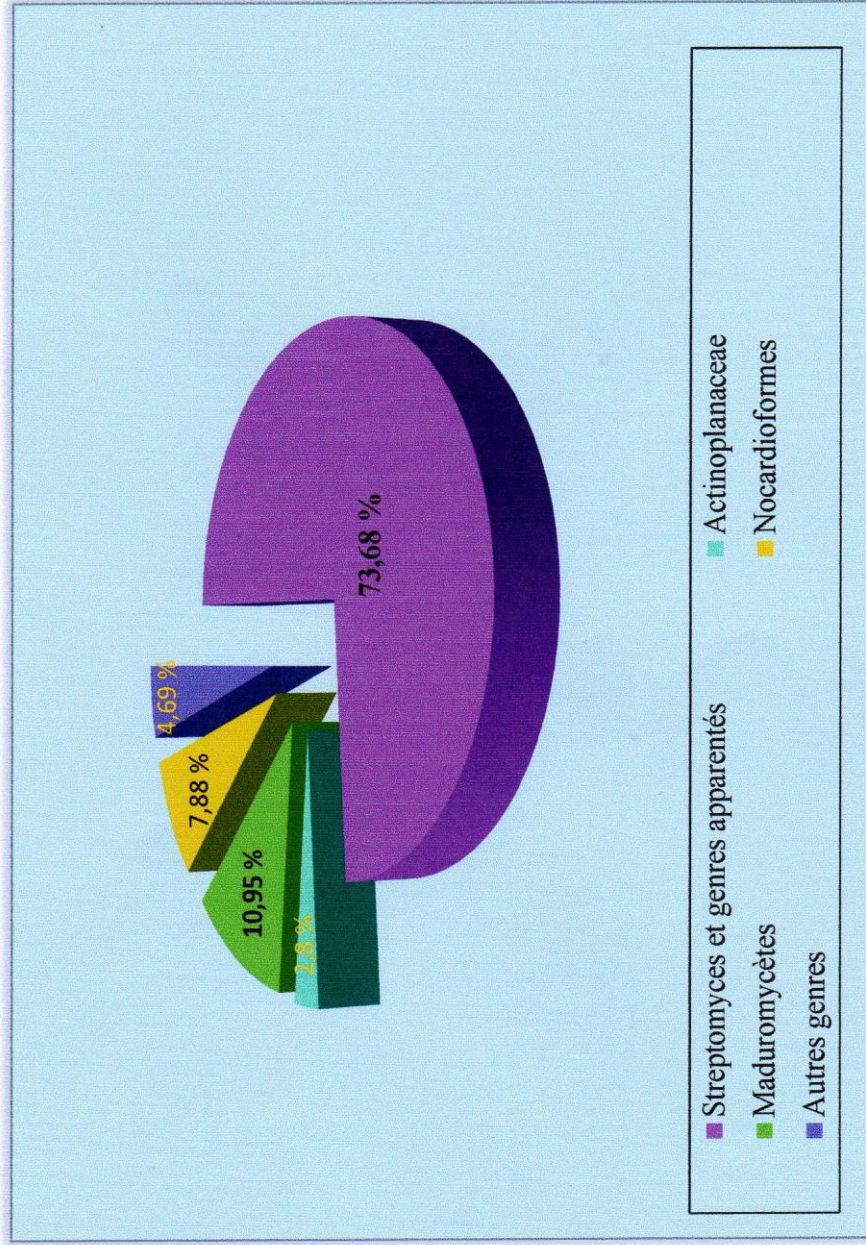


Figure N° 8 b : Sécteur angulaire montrant la répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et genres apparentés, et d'autres genres actinomycétales (Sanglier et Trujillo, 1997)

II-10-3/ L'utilisation des actinomycètes comme bio insecticides et bio pesticides

Les actinomycètes sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (Voir tableau N° 2)

II-11/ Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes

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

II-11-1/ Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes

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

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

II-11-1-1/ Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques

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

La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (**Lebrihi et al., 1988 ; Lounès et al., 1995**) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol (tableau N° 5).

Tableau N° 4 : Quelques exemples d'extrémzymes produites par les actinomycètes

| Actinomycètes extrémophiles | Extrémzymes | T_{opt} | pH_{opt} | Références |
|--|--------------------|--|---------------------------------|---------------------------------|
| 1/ Actinomycètes Alkalithermophiles | | | | |
| <i>Streptomyces sp</i> | Cellulase | 60 °C | 8 | Aboul-Enein et al., 2010 |
| <i>Streptomyces sp</i> | Kératinase | 50 °C | 8,5 | Korkmaz et al., 2003 |
| <i>Streptomyces sp</i> | Endocellulase | 50 °C | 8 | Van Soulingher et al., |
| <i>Streptomyces anulatus</i> | Dextranase | 50 °C | 8 | Decker et al., 2001 |
| <i>Thermomonospora sp</i> | Endocellulase | 50 °C | 5 | George et al., 2001 |
| | | Stabilité à pH = [7 – 10] t _{1/2} vie : 3 heures à 70 °C | | |
| 2/ Actinomycète thermophile | | | | |
| <i>Streptomyces spp</i> | Glucose isomérase | 70 °C | 6,9 | Dhungel et al., 2007 |
| <i>Streptomyces sp</i> | Xylanase | 60 °C | 6,5 | Rawashdeh et al., 2005 |
| 3/ Actinomycète alkaliphile | | | | |
| <i>Streptomyces fradiae</i> | Aminopéptidase | | 10 | Vitale, 1999 |
| 4/ Actinomycète halo-alkaliphile | | | | |
| <i>Streptomyces clavuligerus</i> | Protéase | [NaCl] | pH _{opt} | |
| | | 5 % | 9 | Thumar et Singh, 2007 |
| 5/ Actinomycète psychrotrophe | | | | |
| <i>Streptomyces sp</i> | Alpha-amylase | 15 °C | T= [5 – 20] °C | Cotarlet et al., 2010 |
| | | T _{opt} | Stabilité thermique de l'enzyme | |

II-11-1-2/ Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures influe sur les rendements. Les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotiques chez les actinomycètes, cela se traduit par un effet de la concentration d'un substrat naturel approprié ou sous forme d'acides aminés lentement métabolisés (tableau N° 6).

II-11-1-3/ Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques

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

Le phosphate inorganique inhibe la synthèse des antibiotiques, chez les actinomycètes. Non seulement le phosphate affecte le niveau de production des antibiotiques et les vitesses de formation mais il peut aussi retarder le délai d'initiation de la synthèse des métabolites secondaires (**Gersh et al., 1979 ; Dekleva et al. ; 1985**)

II-11-2/ Effet du pH, de la température et du temps d'incubation

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

Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture ; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline et un pH basique favorise la sécrétion de tétracycline (**Asanza-Ternuel et al., 1997**).

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

Tableau N° 5 : Effet inhibiteur de certaines sources de carbone rapidement assimilable sur la biosynthèse d'antibiotiques

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

Tableau N° 6 : Production d'antibiotiques chez les actinomycètes favorisée par les acides aminés

| Famille chimique | Antibiotiques | Producteurs | Acides aminés | Références |
|-------------------------|----------------------|----------------------------------|------------------------|-----------------------------------|
| Aminoglycosides | Streptomycine | <i>Streptomyces griseus</i> | Proline | Dulaney, 1948 |
| Béta-lactamines | Céphamycine | <i>Streptomyces clavuligerus</i> | Asparagine / Glutamine | Brana <i>et al.</i>, 1985 |
| Phénicolés | Chloramphénicol | <i>Streptomyces venezuelae</i> | Proline | Shapiro et Vining, 1985 |
| Macrolides | Spiramycine | <i>Streptomyces ambofaciens</i> | Valine | Untrau <i>et al.</i>, 1994 |

— *Partie expérimentale*

Matériel et méthodes

I/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens

I-1/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens

Dix-neuf souches actinomycétales ont été criblées afin de sélectionner la souche la plus productrice de substances bioactives. Il s'agit des souches (S1 : 1(7)' / S2 : 19 / S3 : 20r / S4 : 21 / S5 : 2(3) / S6 : 270 / S7 : 271 / S8 : 36 / S9 : 93 / S10 : A2 / S11: A24 / S12: E1 / S13: E 10 / S14 : E7C / S15 : L'2 / S16 : L25 / S17 : F / S18 : G/ S19 : 101) aimablement fournies par le Dr. KITOUNI M. du laboratoire de Microbiologie appliquée.

I-2/ Spectre antibactérien

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar (voir I-3). Cette activité a été testée vis-à-vis de bactéries tests provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit des bactéries à Coloration de Gram négative (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Escherichia coli* ATCC 29322) et une bactérie à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923) et d'autres d'origine clinique, il s'agit d'*Escherichia coli* 113, *Staphylococcus aureus* 118, *Serratia marscecens* 66, *Salmonella* Heidelberg 1070 (Souches récupérées auprès du CHU de Constantine), *Pseudomonas aeruginosa* 13, *Enterococcus sp* 43 (Souches récupérées auprès de la clinique rénale -DAKSI- de Constantine).

Pour chaque souche, un inoculum a été préparé à partir d'une culture de 18 heures sur milieu Chapman pour les souches de *Staphylococcus aureus* et sur le milieu « Trypticase Soy Agar » (TSA) (Institut Pasteur) pour les autres souches. La densité cellulaire de cet inoculum a été ajustée par dilution dans de l'eau physiologique stérile, et en comparaison avec la solution Mc Farland (Annex N° 2) de façon à obtenir une concentration finale de 10^6 UFC / mL après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (Isu et Onyeagba, 2002). L'activité inhibitrice se traduisant par l'apparition d'une zone d'inhibition a été appréciée après 24 heures d'incubation à 37 °C.

I-3/ Technique des cylindres d'Agar

Dans cette méthode, les souches d'actinomycètes sontensemencées en stries serrées à la surface de dix milieux gélosés différents, coulés en boîtes de Pétri. Après incubation à 28°C pendant sept jours, pour chaque souche étudiée et sur les dix milieux de culture utilisés, des cylindres d'agar de 16 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce.

Les cylindres d'Agar sont déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablementensemencé par écouvillonnage selon la technique de la NCCLS (National Committee for Clinical

Laboratory Standard) avec les bactéries tests. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant quatre heures pour permettre une pré diffusion des substances bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37 °C pendant 24 heures (Gungi *et al.*, 1983).

II/ Choix des milieux optimum de production des substances à activité antibactérienne

Dix milieux de cultures différents (AF, Bennett, CPC, GBA, GELM, GLM, ISP2, NPH, PELG, SF) préconisés pour la production de métabolites antibactériens ont été testés. La composition de tous ces milieux ainsi que celle des milieux de culture exploités dans le test d'activité antibactérienne est donnée en annexe N° 1. Le test d'activité antibactérienne est réalisé par la méthode des cylindres d'Agar (décrite en I-3).

III/ Effet du diamètre des cylindres d'Agar sur l'apparition des zones d'inhibition

Afin d'étudier l'effet du diamètre des cylindres d'Agar sur l'apparition des zones d'inhibition, des cylindres d'Agar de 6 mm et de 16 mm ont été prélevés à partir des milieux de culture préalablement cultivés par la souche 101 prise comme exemple type : GBA, Bennett, ISP2, GELM, SF, AF, et NPH.

Les diamètres des zones d'inhibition sont ensuite comparés afin de conclure si le diamètre des cylindres d'Agar a un effet significatif ou non sur les résultats du test d'activité antibactérienne.

IV/ Effet du pH et de la température sur la production d'antibactériens par les souches 21 et 101

Deux lots de culture bactérienne pour chacune des souches 21 et 101 ont été réalisés respectivement sur les milieux de culture PELG et GELM dont le premier sert à étudier l'effet du pH sur la production d'antibactériens ; les milieux de culture sont ajustés aseptiquement à différents pH allant de 2 à 11 (l'intervalle de 1,0 avec des solutions stériles de NaOH et HCl 1 fois normale. Les cultures sont incubées à 28 °C pendant sept jours.

Le second sert à étudier l'effet de la température sur la production d'antibactériens par les souches 21 et 101 cultivées respectivement sur le milieu de culture PELG et GELM (à pH 7 et 7,2 respectivement). Les cultures bactériennes sont incubées à différentes températures : 28 °C, 30 °C, 37°C, 45 °C, et 60 °C pendant sept jours.

V/ Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives produites par les souches 21 et 101

V-1/ Culture des souches actinomycétales 21 et 101 en milieu solide

Afin de choisir le meilleur solvant d'extraction, cinq solvants de polarité différente ont été utilisés : le butanol, le chloroforme, l'hexane, le dichlorométhane et l'isoamyleacétate. 0,1 ml de la suspension sporale de la souche 21 et de la souche 101 est ensemencé en stries serrées respectivement sur le milieu PELG et le milieu GELM, et incubée à 28 °C pendant sept jours. Des cylindres d'Agar de 16 mm de diamètre sont alors prélevés à l'emporte-pièce et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton (Institut Pasteur) préalablement ensemencé par les bactéries-tests afin de vérifier la présence de substances bioactives. Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Dans le cas positif (présence d'activité), les cylindres d'Agar des différentes cultures sont extraits pendant 7 jours à température ambiante et sous agitation avec 50 ml de différents solvants suscités (**Kitouni, 2007**).

V-2/ Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits organiques (méthode des disques en papier)

Des disques stériles non imprégnés de 6 mm de diamètre préparés à partir du papier Wathman N° 4 reçoivent 200 µl des extraits chloroformiques, hexanoïques, dichlorométhanoïques, butanoliques et isoamyle acétatiques de la culture solide de la souche 21 et de la souche 101 sur le milieu PELG et GELM respectivement et des disques témoins reçoivent 200 µl des différents solvants purs (par dépôts successifs de 10 µl chacun tout en évitant les débordements). Après séchage sous courant d'air chaud, les disques sont déposés soigneusement sur les boîtes de Pétri contenant du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillon selon la technique de la NCCLS avec les souches tests (*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) sélectionnées pour cette étape. Avant l'incubation à la température optimale de croissance de chaque souche test, les boîtes sont laissées 2 heures à + 4 °C pour permettre une pré-diffusion des substances bio actives (**Tortorano et al., 1979**). La lecture des résultats est réalisée après 24 heures. Toute zone d'inhibition de croissance autour des disques, même de faible diamètre, est considérée comme résultat positif.

VI/ Caractérisation préliminaire des substances à activité antibactérienne produites par les souches 21 et 101

VI-1/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction du pH

Des fractions de 6 ml des extraits chloroformiques et isoamyle acétatiques bruts pour la souche 21 et les extraits isoamyle acétatiques bruts pour la souche 101 ont été ajustées à différentes valeurs du pH allant de 2 à 10 (intervalle de 1,0) avec des solutions stériles de NaOH et HCl 1 fois normale. Toutes les fractions sont laissées deux heures à 4°C. Elles ont ensuite été testées par la technique des disques en papier (décrite en III-2) et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits non traités (**Zbinovski et al., 1968**).

VI-2/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la température

Des fractions de 6 ml des extraits actifs chloroformiques et isoamyle acétatiques ont été soumises à un traitement par différentes températures : -20°C, 50°C, 70°C et 100°C pendant 30 min. Elles ont ensuite été testées par la technique des disques en papier (voir III-2) et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits non traités (**Kitouni, 2007**).

VI-3/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la lumière

Des fractions de 6 ml des extraits actifs bruts ont été exposées à l'action d'une lampe d'une puissance de 75 Watt, placée à une hauteur de 50 cm, et d'autre sont placées à température ambiante et à l'obscurité. Après un temps d'exposition de 24 heures, l'activité des différents extraits a été testée par la technique des disques en papier (voir III-2) et l'activité a été comparée à celle obtenue avec les extraits sans traitement (**Kitouni, 2007**).

VI-4/ Spectre UV-Visible des molécules bioactives

L'absorption entre 220 et 600 nm des extraits actifs bruts (chloroformiques et isoamyle acétatiques) est réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre de type JENWAY (6315, Allemagne). Les mesures ont été réalisées dans des cuves en quartz avec un trajet optique de 10 mm.

VI-5/ Essais de séparation et de caractérisation des molécules bioactives produites par les souches actinomycétales 21 et 101

VI-5-1/ Concentration des extraits organiques bruts des souches 21 et 101 et évaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques

Les extraits actifs bruts des souches 21 et 101 sont filtrés puis évaporés sous vide à 45 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif (BUCHI – Switzerland). Le résidu sec est ensuite repris

Dans 17 ml de méthanol et l'activité antibactérienne est évaluée en utilisant des disques en papier de 6 mm de diamètre (20 µl contre : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923) (**Badji et al.; 2005**).

VI-5-2/ Chromatographie sur couche mince de silicagel

Six microlitres de chaque extrait méthanolique des souches actinomycétales 21 et 101 sont déposés à l'aide d'une micro seringue sur des plaques de CCM en verre (10 × 20 cm, 20 × 20 cm) préalablement étalées par une couche mince de gel de silice GF₂₅₄ (Merck). Ces plaques sont ensuite maintenues verticaux dans des cuves de CCM contenant les systèmes de solvants suivants : A. M : acétate d'éthyl- méthanol (100 : 15, v / v), B. A. E : N-butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1, v / v) et E. A. E : éthanol-ammoniaque-eau (8 : 1 : 1, v / v) (**Badji et al.; 2005**).

Les chromatogrammes sont ensuite développés dans les mêmes conditions par les révélateurs chimiques suivants : la ninhydrine, la vanilline-H₂SO₄, cristaux d'iode, α- naphthol-acide sulfurique-éthanol (voir annexe N°5).

Résultats et discussion

I/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens

I-1/ Choix des milieux optimum de production des substances à activités antibactériennes

L'activité antibactérienne a été mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Selon la quelle, nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les bactéries tests utilisées.

Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible comme le montre les planches N° 1et 2. Le reste des planches est présenté dans l'annexe N°4.

Toutes les photographies ont été prises par un appareil photo numérique «FUJIFILM» de résolution de 10,2 Méga pixel (Zoom optique x1).

Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les *Streptomyces*. Pour cette raison, nous avons testé l'activité antibactérienne des 19 souches actinomycétales sur dix milieux de culture afin de choisir le meilleur milieu de production d'antibactériens.

Le choix du meilleur milieu de production peut être s'expliqué sur deux niveaux :

1/ Quantitatif. Les résultats du tableau N° 7 montrent que la plus grande moyenne des diamètres des zones d'inhibition est obtenue avec les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de culture de Bennett (**22,42 mm**) suivie par celle du milieu de culture ISP2 (**21,75 mm**) tandis que la plus faible moyenne des diamètres des zones d'inhibition est obtenue avec les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de culture PELG (**19,6 mm**).

Le pourcentage le plus élevé des souches actives s'observe sur les actinomycètes cultivés sur les milieux de culture Bennett et ISP2 (11 souches sur 19 sont actives soit **57,89 %**) et le pourcentage le plus faible des souches actives est celui des actinomycètes cultivés sur le milieu de culture SF (5 sur 19 souches sont actives soit **26,31 %**) (Voir figure N° 9).

La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec les cylindres d'Agar de la souche actinomycétale 93 cultivée sur le milieu de culture de Bennett avec un diamètre de **36 mm**, suivie par celle de la souche 20r cultivée sur le milieu de culture ISP2 (**30 mm**).

2/ Qualitatif. Les milieux de culture PELG et ISP2 permettent la production d'une large variété d'antibactériens (8 sur 9 bactéries tests sont sensibles) tandis que les milieux GBAet NPH permettent la production d'une variété plus étroite d'antibactériens (4 sur 9 bactéries tests sont sensibles) (Voir Tableau N° 8 et Figure N° 10).

La moyenne des diamètres des zones d'inhibition des souches actinomycétales actives (tableau N° 7) ainsi que le pourcentage de ces dernières (tableau N° 8) sont calculés à partir des résultats des tableaux N° 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18.

Tableau N° 7 : La moyenne des diamètres des zones d'inhibition des souches d'actinomycètes actives pour chaque milieu de culture

| Milieux de culture | La moyenne des diamètres des zones d'inhibition en (mm) |
|---------------------------|--|
| GBA | 21,09 |
| ISP2 | 21,75 |
| Bennett | 22,42 |
| GELM | 21,07 |
| GLM | 21,09 |
| NPH | 21 |
| CPC | 20,78 |
| SF | 20,6 |
| AF | 19,86 |
| PELG | 19,6 |

Tableau N° 8 : Pourcentage des souches d'actinomycètes actives à activité antibactérienne cultivées sur les dix milieux de culture

| Milieux de culture | Bactéries-tests utilisées | | | | | | | | | |
|--------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|----------------------------------|--|-------------------------------|--|
| | <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | <i>Escherichia coli</i> 113 | <i>Enterococcus sp</i> 43 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Serratia marscecens</i> 66 | |
| GBA | | | 21,05 | | 5,26 | 10,52 | | 21,05 | | |
| ISP2 | | 5,26 | 15,78 | 26,31 | 5,26 | 5,26 | 15,78 | 5,26 | 5,26 | |
| Bennett | | | 15,78 | 26,31 | | 21,05 | 5,26 | 26,31 | 5,26 | |
| GELM | | | 10,52 | 21,05 | | 5,26 | 15,78 | 15,78 | | |
| PELG | 5,26 | | 10,52 | 10,52 | 5,26 | 5,26 | 5,26 | 15,78 | 21,05 | |
| GLM | | | 15,78 | 5,26 | | 15,78 | 10,52 | 10,52 | | |
| NPH | 5,26 | | 15,78 | | | | 15,78 | 15,78 | | |
| CPC | | | 21,05 | | 21,05 | 15,78 | 5,26 | 10,52 | | |
| SF | 10,52 | | 5,26 | 5,26 | | 5,26 | 5,26 | 21,05 | 5,26 | |
| AF | 10,52 | | 10,52 | | | | 10,52 | 21,05 | 5,26 | |

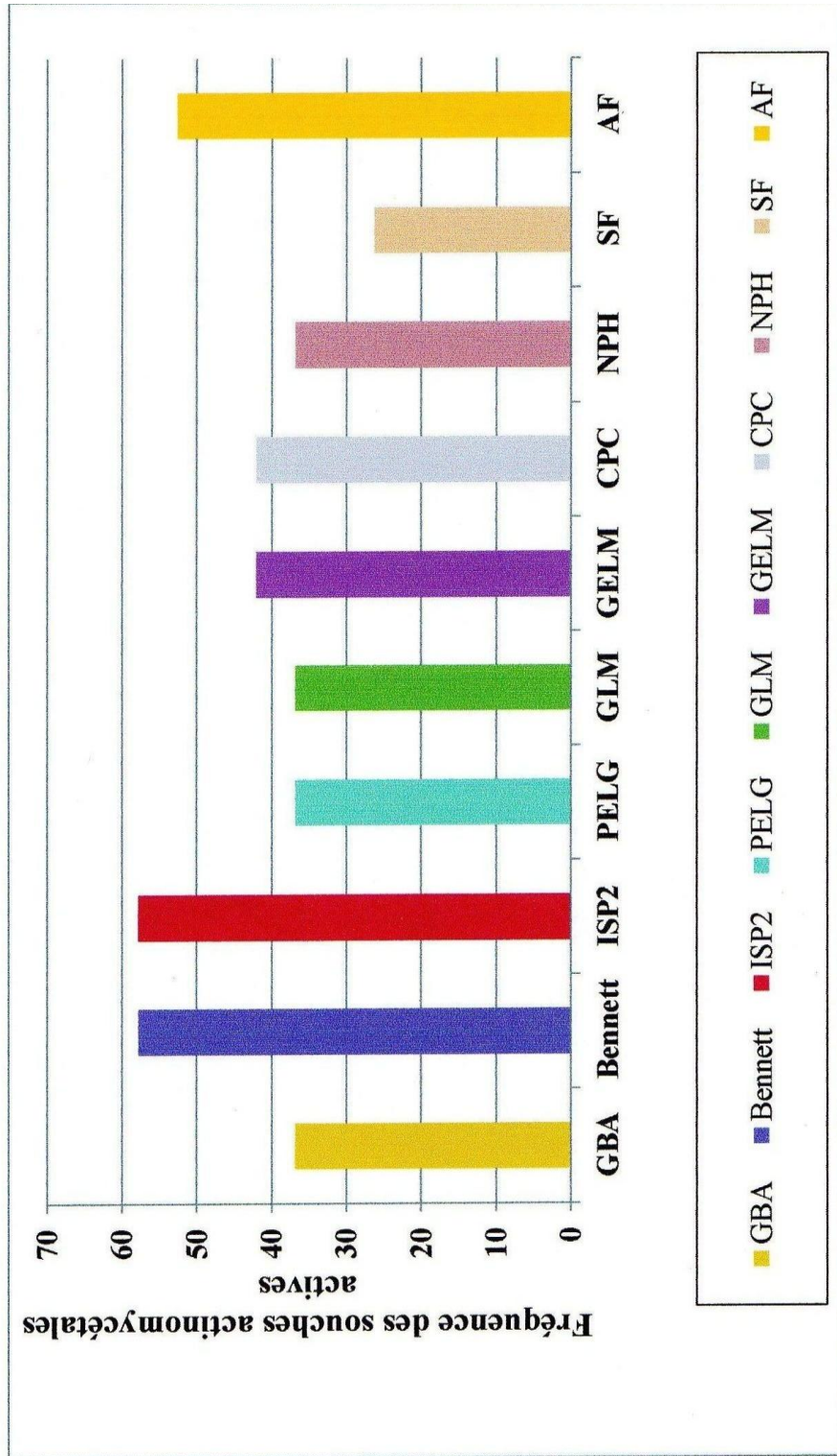


Figure N° 9 : Diagramme en batons montrant la fréquence des souches actinomycétales actives pour chaque milieu de culture

Ces résultats font ressortir le milieu de Bennett comme le meilleur milieu de production d'antibactériens pour l'ensemble des actinomycètes du point de vue quantitative, ces résultats sont conformes avec ceux obtenus par **KITOUNI *et al.*; (2005)**.

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

Le milieu de culture PELG est choisi comme le meilleur milieu de production d'une large variété de biomolécules antibactériennes et le milieu ISP2 comme le meilleur milieu de production d'antibactériens sur les niveaux quantitatif et qualitatif à la fois.

D'après **Aharonowitz et Demain (1978)**; **Omura et Tanaka (1986)**; **Cheng *et al.*; (1995)**; **Sanchez et Demain (2002)**, la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la capacité et la quantité de métabolites secondaires produits par le microorganisme en question: la zone d'inhibition provoquée par les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de culture ISP2 cultivé par la souche E10 contre *Staphylococcus aureus* 118 est de l'ordre 25 mm, ce diamètre est réduit à 17 mm contre la même bactérie test lorsque la souche E10 est cultivée sur le milieu de culture AF et cette activité antibactérienne disparaît totalement lors de la mise en culture de cette souche sur le milieu de culture CPC.

I-2/ Criblage de la souche la plus productrice d'antibactériens

Les tableaux N° 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, et 18 présentent les diamètres des zones d'inhibition des 19 souches actinomycétales envers les 9 bactéries tests choisies.

Pour chaque souche actinomycétale, les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à l'autre et d'une bactérie-test à l'autre.

Sur les 19 souches d'actinomycètes testées, 18 souches sont actives envers au moins une bactérie-test.

La souche L25 n'a pas d'activité antibactérienne détectée sur les dix milieux de culture utilisés tandis que les souches 1(7)', 270, 36, A24, 20r, 2(3), 19, A2, 271 et E7C montrent une activité antibactérienne sur un nombre limité de milieux de culture.

Les souches F, 21, et 101 présentent une activité antibactérienne sur un nombre élevé de milieux de culture.

Les souches 1(7)', 36, A24, 2(3), A(2), G, et F présentent une activité antibactérienne envers les bactéries-tests à coloration de Gram négative seulement.

Tableau N° 9 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture AF

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|----|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 17 |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | 22 | 20 | - | 21 | - | - | 20 | - | - | 21 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | 19 | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | 17 | - | - | - | - | 20 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marscecens</i> 66 | 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | - | - | - | 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 10 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture de Bennett

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|----|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 23 | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | 17 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 21 | 21 | - | - | - | - | - | 18 | - | - | 23 | - | 17 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | 24 | - | - | 27 | - | - | - | - | - | 22 | 29 | 23 | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marscecens</i> 66 | - | 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | 23 | - | 36* | - | - | 24 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 17 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 23 |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 11 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture de CPC

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|---|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 21 | - | - | - | - | 21 | - | - | - | 23 | - | - | - | - | - | 18 | - | 21 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | 31 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | 18 | - | 18 | - | 18 | - | 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marcescens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 29* | - | 18 | - | - | - | - | - | 19 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

La plus grande zone d'inhibition a été obtenue avec la souche actinomycétale 93 cultivée sur le milieu de culture de Bennett contre la bactérie-test : *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

Prenons en considération le nombre élevé de milieux de culture dans lesquels les molécules antibactériennes sont produites additionnant la diversité de bactéries cliniques envers les quelles sont actives, les souches 21 et 101 sont sélectionnées comme les plus productrices d'antibactériens, parmi les 19 souches d'actinomycètes étudiées.

Sur les neuf bactéries-tests exploitées, *Escherichia coli* 113 apparaît comme la souche la plus résistante dont une seule souche actinomycétale est active vis-à-vis d'elle. Tandis que les deux souches *Enterococcus sp* et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 sont les plus sensibles aux antibactériens produits par les actinomycètes étudiées.

L'utilisation intensive des antibiotiques a provoqué une augmentation inquiétante de la multi résistance de bactéries pathogènes, la résurgence de maladies infectieuses et l'émergence de nouveaux pathogènes.

Les infections staphylococciques dues à *Staphylococcus aureus* occupent en pathologie infectieuse une place importante par leur nombre et leur gravité ; aussi bien à l'hôpital qu'à l'extérieur de celui-ci (**Fleurette, 1990**).

En 2002, l'*European Antimicrobial Resistance Surveillance System (EARSS)* a collecté les données concernant 49 400 épisode d'infections invasives essentiellement des bactériémies : 6747 à *Streptococcus pneumoniae*, 18 726 à *Staphylococcus aureus*, 20 034 à *Escherichia coli* et 3893 à *Enterococcus* (**Trystram et al., 2004**).

En Algérie, le taux de résistance à la pénicilline G est d'environ 12, 5 % (**Smati et al., 1994**). Les pourcentages de résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM) étaient les plus élevés dans les pays du Sud de l'Europe (Grèce 44 %, Italie 38 %, Portugal 38 %, France 33 %, Espagne 23 %). Comparé à 2001, les pourcentages de SARM en 2002 étaient demeurés identiques pour la France mais avaient augmenté (19 % à 22 %) pour l'ensemble de pays participants.

Les entérobactéries du groupe KES ont longtemps été considérées comme habituellement commensales, rarement pathogènes. L'emploi intensif des antibiotiques a entraîné la sélection de souches multi résistantes de *Klebsiella pneumoniae*. Ces espèces sont devenues des pathogènes opportunistes que l'on isole d'infections urinaires et pulmonaires, de pus, de septicémies, avec une fréquence croissante en milieu hospitalier (**Le Minor et al., 1990**). Les infections graves à bacille pyocyanique sont connues depuis la fin du XIX siècle.

Tableau N° 12 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture de GBA

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|-----|----|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|---|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 22 | - | - | - | - | - | - | - | 24 | - | - | - | - | - | - | 20 | - | 22 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | 25* | - | - | 21 | - | - | 24 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marsecens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | 17 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 13 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture de GELM

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|-----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|----|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 21 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 23 | - | 17 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | 23 | - | - | - | - | - | - | 24 | - | 23 | - | - | - | 22 | - | 20 | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marscecens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 18 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | 18 | 27* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 14 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture de GLM

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|---|---|-----|----|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 20 | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | 22 | 17 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | - | - | - | - | - | 17 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 29* | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marscecens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | 25 | - | - | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 17 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

L'usage intensif a conduit, surtout en milieu hospitalier, à une sélection fréquente de souches de *Pseudomonas aeruginosa*, résistante à la majorité des antibiotiques (Véron, 1990).

L'utilisation importante de la ciprofloxacine a été associée à une baisse de sensibilité des souches de *Pseudomonas aeruginosa*. Le nombre de souches de sensibilité diminuée (CMI : 2- 4 mg /l a augmenté de 1% en 1985-1986 à 10,8 % en 1989) (Véron, 1990).

Basant sur ces données épidémiologiques, les trois souches bactériennes suivantes : *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont sélectionnées pour la suite de notre travail.

Le milieu PELG est choisi comme le meilleur milieu de production d'antibactériens par la souche 21 envers les trois bactéries-tests précédemment sélectionnées avec des diamètres de zones d'inhibition significativement grands par rapport aux autres milieux de culture.

Concernant la souche 101, le milieu GELM est choisi comme le meilleur milieu de production d'antibactériens actifs vis-à-vis *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et *Pseudomonas aeruginosa* 13 à la fois contrairement aux autres milieux de culture.

Au bilan, les résultats figurés dans les tableaux N° 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 nous permettant de conclure que, d'une part, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre, et d'autre part, pour la même souche actinomycétale et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre.

Ces variations de résultats du test d'activité antibactérienne s'explique par le fait q'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature de ces dernières dépend de la composition (la nature et la concentrartion des composants) du milieu de culture.

II/ Effet du diamètre des cylindres d'Agar sur l'apparition des zones d'inhibition

Afin d'étudier l'effet du diamètre des cylindres d'Agar sur l'apparition des zones d'inhibition et donc sur l'activité antibactérienne, le tableau N° 19 récapitulant quelques critères pris en comparaison entre les diamètres des zones d'inhibition engendrées par les cylindres de 6 mm et ceux engendrés par les cylindres de 16 mm de la souche d'actinomycète 101.

Les résultats du test d'activité antibactérienne restent presque les mêmes, quelque soit le diamètre des cylindres d'Agar utilisés, ceci est bien confirmé par les résultats du 2^{ème} et 3^{ème} critère de comparaison.

Tableau N° 15 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture ISP2

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|----|-----|---|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 17 | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 19 | - | - | - | - | - | - | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 23 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | 22 | - | - | - | 30* | - | - | - | - | 22 | 22 | - | - | 20 | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marscecens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 17 | - | 20 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | 24 | - | - | 25 | 25 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 16 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture INPH

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|-----|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 25* |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 21 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | - | 24 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | 19 | 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 18 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marscecens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | 18 | - | - | - | - | 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 17 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture IPELG

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|----|---|-----|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 24 | - | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | 17 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 18 | 25* | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 18 | - | - |
| <i>Serratia marsecens</i> 66 | - | 19 | - | - | - | - | - | - | 17 | - | - | - | - | - | - | 17 | 20 | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | 23 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | 18 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

Tableau N° 18 : Activité antibactérienne des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de culture SF

| <i>Bactéries-tests</i> | Diamètres en (mm) des zones d'inhibition provoquées par les actinomycétales étudiées | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
|--|--|-----|-----|----|----|-----|-----|-----|------|----|----|----|-----|-----|-----|-----|-----|---|-----|---|
| | 1(7)' | 21 | 270 | 93 | 36 | A24 | E10 | 20r | 2(3) | 19 | E1 | A2 | L'2 | 271 | L25 | E7C | F | G | 101 | |
| <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 | - |
| <i>Escherichia coli</i> 113 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Enterococcus sp</i> 43 | - | 17 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 23 | - |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | 24* | - | - | - | 22 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 24* | - | 18 | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 19 | - | - | - |
| <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Serratia marsecens</i> 66 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | 19 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

- : Pas d'inhibition (diamètre de la zone d'inhibition = 16 mm)

* : le diamètre de la plus grande zone d'inhibition

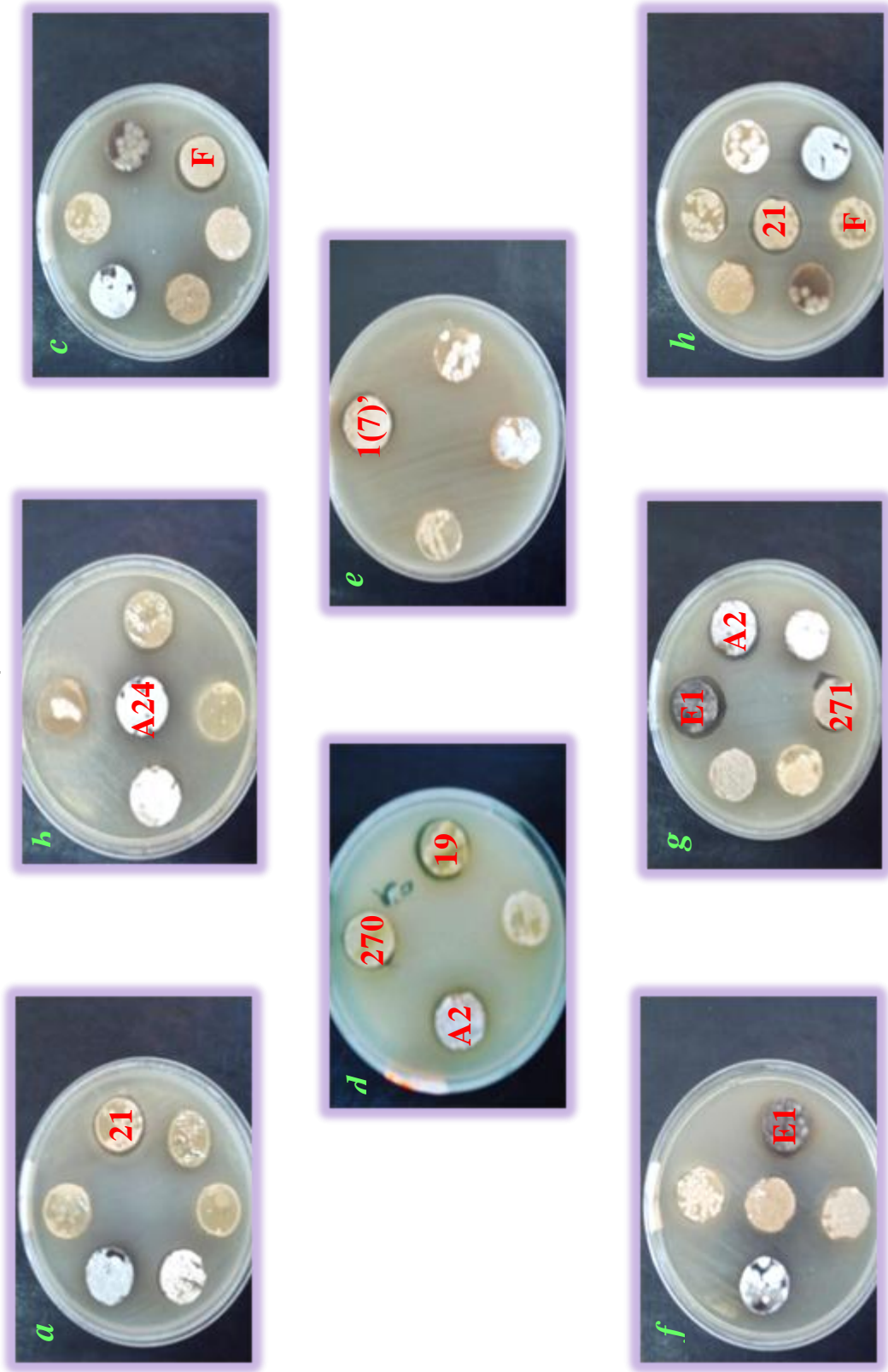


Planche N° 1 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu AF contre : (a, c et g) *Enterococcus sp 43*, (b) *Staphylococcus aureus 118*, (d et h) *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603*, (e) *Serratia marsecens 66* (f) *Staphylococcus aureus 118* par la technique des cylindres d'Agar

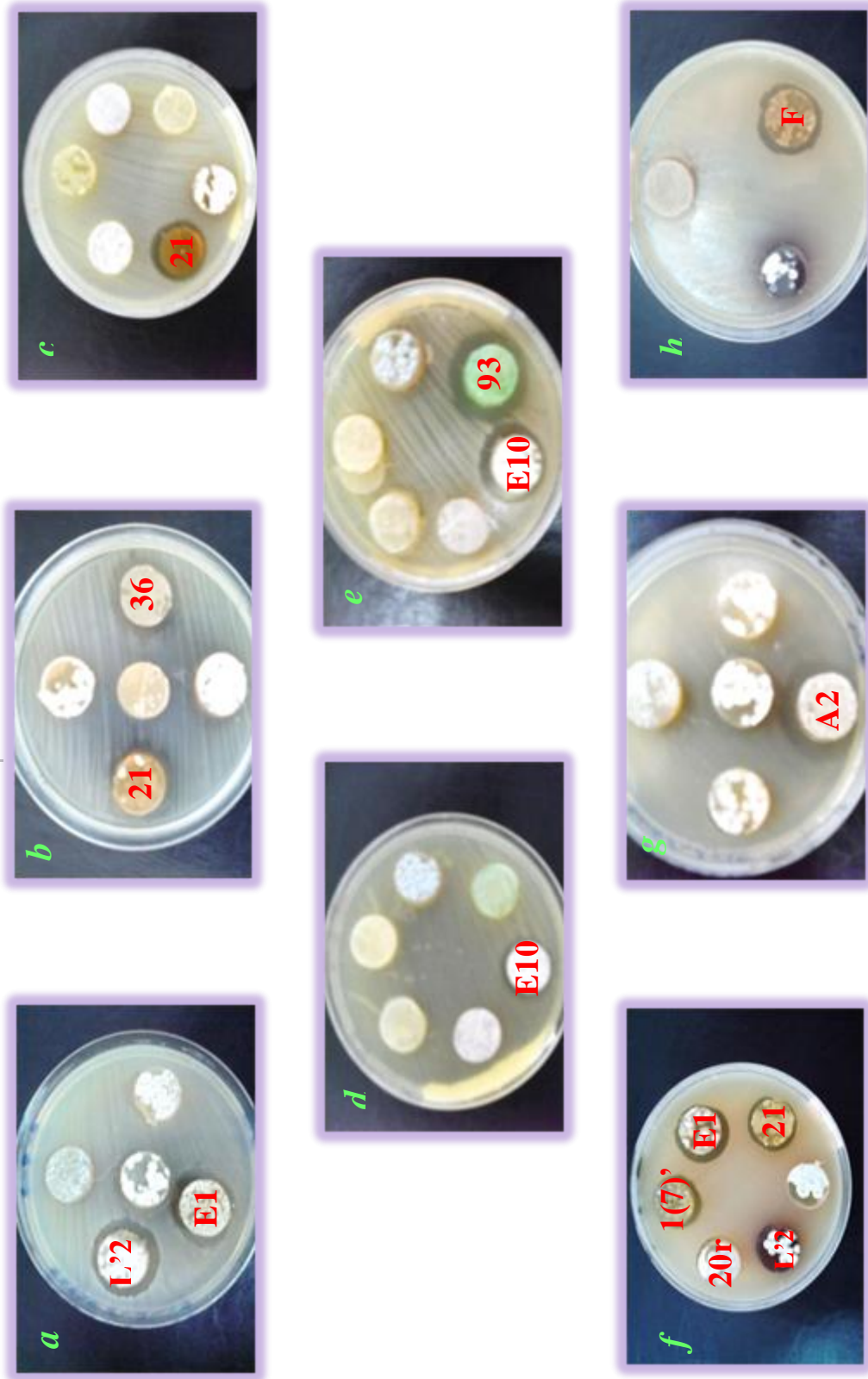


Planche N° 2 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu de Bennett contre : (a, b et g) *Pseudomonas aeruginosa* 13, (c et d) *Enterococcus* sp 43, (e) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (f) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (h) *Staphylococcus aureus* 118 par la technique des cylindres d'Agar

Pour le 1^{er} et le 4^{ème} critère, les différences observées nous permettent, d'une part, de conclure que le diamètre des zones d'inhibition a un effet sur les résultats du test d'activité antibactérienne, et d'autre part, de sélectionner les cylindres d'Agar de 6 mm pour avoir des résultats reproductibles pour le test d'activité antibactérienne. Notons que ces conclusions sont valables pour la souche actinomycétale 101 cultivée sur les sept milieux de culture dont son activité antibactérienne est testée envers les neuf bactéries-tests exploitées dans notre travail.

Tableau N° 20 : récapitulatif des résultats de l'activité antibactérienne de la souche actinomycétale 101 en fonction du diamètre des cylindres d'Agar

| Facteurs | Cylindres d'Agar de 6 mm | Cylindres d'Agar de 16 mm |
|---|---|---|
| Bactéries-tests | 44 % des bactéries-tests sont résistantes | 55 % des bactéries-tests sont résistantes |
| Milieux de culture | Les cylindres d'Agar de sept milieux de culture montrant une activité antibactérienne envers au moins une bactérie-test | Les cylindres d'Agar de sept milieux de culture montrant une activité antibactérienne envers au moins une bactérie-test |
| Moyenne des diamètres des zones d'inhibition | 9,13 mm | 19,27 mm |
| Diamètre de la plus grande zone d'inhibition | 13,33 mm. Cette zone est engendrée par les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de culture ISP2 contre <i>Enterococcus</i> sp 43. Ce diamètre représente le double de celui des cylindres utilisés | 24,66 mm. Cette zone est engendrée par les cylindres d'Agar prélevés à partir du milieu de culture NPH contre <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322. Ce diamètre est supérieur à celui des cylindres utilisés par la moitié |

Tableau N° 19: Activité antibactérienne en (mm) de la souche 101 en fonction des milieux de culture, le diamètre des cylindres d'Agar, et les bactéries-tests

| Milieux de culture testés | Diamètre des cylindres d'agar | Bactéries-tests | | | | | | | | | |
|---------------------------|-------------------------------|------------------------------------|-----------------------------|---------------------------|----------------------------------|-----------------------------------|---|----------------------------------|--|-------------------------------|--|
| | | <i>Escherichia coli</i> ATCC 29322 | <i>Escherichia coli</i> 113 | <i>Enterococcus sp</i> 43 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | <i>Salmonella</i> Heidelberg 1071 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | <i>Staphylococcus aureus</i> 118 | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Serratia marscecens</i> 66 | |
| GBA | 6 mm | - | - | - | [10, 86 ± 1, 82] | - | - | - | - | - | |
| | 16 mm | - | - | [21, 66 ± 2, 17] | - | - | [17, 33 ± 1, 74] | - | - | | |
| Bennett | 6 mm | - | - | [9, 66 ± 1, 8] | - | - | [7, 66 ± 1, 72] | - | - | | |
| | 16 mm | - | - | 17 | - | - | [17, 33 ± 1, 74] | - | - | | |
| ISP2 | 6 mm | - | - | [13, 33 ± 1, 69] | - | - | 7 | - | - | | |
| | 16 mm | - | - | 20 | - | - | 17 | - | - | | |
| GELM | 6 mm | - | - | 12 | - | - | - | - | - | | |
| | 16 mm | - | - | 21 | 20 | - | [17, 66 ± 2, 04] | 17 | - | | |
| SF | 6 mm | - | - | - | - | - | - | 7 | - | | |
| | 16 mm | 20 | - | [22 ± 4, 3] | - | - | - | [17, 66 ± 2, 04] | - | | |
| AF | 6 mm | - | - | 7 | - | - | - | 7 | - | | |
| | 16 mm | 17 | - | 21 | - | - | - | - | - | | |
| NPH | 6 mm | - | - | 10 | - | - | - | - | - | | |
| | 16 mm | [24, 66 ± 2, 25] | - | [23, 33 ± 1, 85] | - | - | - | - | - | | |

III/ Effet du pH et de la température sur la production d'antibactériens par les souches actinomycétales 21 et 101

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

Les tableaux N° 21, 22, 23 et 24 représentent les diamètres des zones d'inhibition en fonction du pH et de la température

Pour la souche 21. Concernant le pH. La souche 21 possède une large gamme de pH de croissance qui varie de 2 à 11. Au contraire pour la production d'antibactériens, l'intervalle est beaucoup plus étroit (tableau N° 22). En ce qui concerne *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, l'inhibition a été obtenue avec la souche 21 à des pH neutre et voisins de la neutralité tandis que les antibactériens actifs contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont produits dans des conditions d'alcalinité ($8 \leq \text{pH} \leq 11$). Contrairement aux deux types de molécules bioactives précédentes, les antibactériens actifs vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* 13 sont produites dans une large gamme du pH allant du 6 à 11.

L'activité antibactérienne est optimale à pH = 6 contre *Pseudomonas aeruginosa* 13, à pH = 8 contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et à pH = 7 contre *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (d'après les diamètres des zones d'inhibition).

Concernant la température. La souche 21 possède un intervalle assez étroit de température de croissance, variant entre 28 °C et 37 °C. La gamme correspondante pour la production d'antibactériens est beaucoup plus étroite et varie entre 28 °C et 30 °C pour les trois bactéries-tests à la fois (tableau N° 21).

Tableau N° 21 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 21 cultivée sur le milieu de culture PELG, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction de la température

| <i>Bactéries tests</i> | Températures étudiées | | | | |
|--|-----------------------|-------|------|-------------------|------|
| | 28°C | 30°C | 37°C | 45°C | 65°C |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 19,66 | 19 | - | Pas de croissance | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 20 | 20 | - | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 22,33 | 21,66 | - | | |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Tableau N° 22 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 21 cultivée sur le milieu de culture PELG, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction du pH

| <i>Bactéries tests</i> | Valeurs de pH étudiées | | | | | | | | | |
|--|-------------------------------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------|-----------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | - | - | - | 22,66 | 22,33 | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | 25 | 20,66 | 21,66 | 24,33 | 24,66 | 24,66 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | 24 | 23,66 | 23,66 | 23,66 |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Pour la souche 101. Elle possède une gamme du pH de croissance plus étroite que celle de la souche 21, variant de 5 à 11.

L'intervalle correspondant pour la production d'antibactériens varie d'une bactérie-test à l'autre (tableau N° 24) ; la production de biomolécules actives envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 a eu lieu à des pH compris entre 8 et 11. La plus grande zone d'inhibition a été obtenue à pH = 10. La souche *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 est inhibée par des antibiotiques produits à pH compris entre 5 et 11 avec une production maximale à pH = 7.

Aucune zone d'inhibition de croissance de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 n'a été observée sur toute la gamme du pH testée.

Concernant la température, la souche 101 possède une gamme assez étroite de température de croissance et de production d'antibactériens vis-à-vis des bactéries tests utilisées (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* 13). Elle est comprise entre 28 °C et 37 °C (tableau N° 23).

Tableau N° 23 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 101 cultivée sur le milieu de culture GELM, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction de la température

| <i>Bactéries tests</i> | Températures étudiées | | | | |
|--|------------------------------|-------------|-------------|-------------------|-------------|
| | 28°C | 30°C | 37°C | 45°C | 65°C |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 17 | - | - | Pas de croissance | |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 20 | 20 | - | | |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 17,66 | 18 | 21 | | |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Tanaka (1992) montre que les optima de pH et de température pour la production d'antibiotiques sont généralement plus bas que celle pour la croissance.

Il faut noter que ces deux conditions sont fonction des bactéries actinomycétales, des bactéries-tests, et des milieux de culture. Il a été rapporté par **Dumenil et Sanglier (1989)** que les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance et sont fonction de la souche étudiée.

Puisque les souches d'actinomycètes 21 et 101 peuvent se développer à des pH compris entre 8 et 11 et à des températures comprises entre 28 °C et 37 °C, **Singh et al., (2009)** suggèrent l'inclusion de ce type de bactéries actinomycétales se développant dans ces conditions dans le groupe des bactéries alcaliphiles-mésophiles.

Tableau N° 24 : Activité antibactérienne en (mm) de la souche 101 cultivée sur le milieu de culture GELM, vis-à-vis les bactéries-tests en fonction du pH

| <i>Bactéries tests</i> | Valeurs de pH étudiées | | | | | | | | | | |
|--|------------------------|---|---|---|----|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | - | - | - | 22,66 | 22,33 | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | 25 | 20,66 | 21,66 | 24,33 | 24,66 | 24,66 | 24,66 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | 24 | 23,66 | 23,66 | 23,66 | 23,66 |

IV/ Choix du meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives produites par les souches actinomycétales 21 et 101

IV-1/ Culture des souches actinomycétales 21 et 101 en milieu solide

Afin de vérifier la présence de production d'antibactériens, l'activité antibactérienne des souches 21 et 101 a été mise à nouveau par la méthode des cylindres d'Agar (voir I-3). Les résultats du test d'activité sont rassemblés dans le tableau N° 25 et sont présentés dans la planche N° 3.

La persistance de l'activité antibactérienne des souches 21 et 101 sur les milieux de culture PELG et GELM respectivement renforce notre choix de ces derniers comme meilleurs milieux de production d'antibactériens afin de les exploiter dans la partie IV-2.

Tableau N° 25 : Activité antibactérienne en (mm) des souches actinomycétales 21 et 101 cultivées respectivement sur le milieu de culture PELG et GELM

| Bactéries-tests | Milieux de culture | |
|--|--------------------|--------|
| | PELG | GELM |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 22, 66 | 17 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 24, 33 | 20 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 22, 33 | 17, 66 |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

IV-2/ Evaluation de l'activité antibactérienne des différents extraits organiques (méthode des disques en papier)

Cinq solvants de polarité différente (l'hexane, le dichlorométhane, le chloroforme, l'isoamyle acétate, et le butanol) ont été utilisés pour extraire les molécules bioactives à partir du milieu de culture PELG et GELM.

Quelques propriétés physico-chimiques de ces solvants organiques sont indiquées dans l'annexe N° 3.

Le test d'activité contre les bactéries-tests (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Pseudomonas aeruginosa* 13, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603) a été réalisé par la technique des disques en papier de 6 mm de diamètre (planche N° 4).

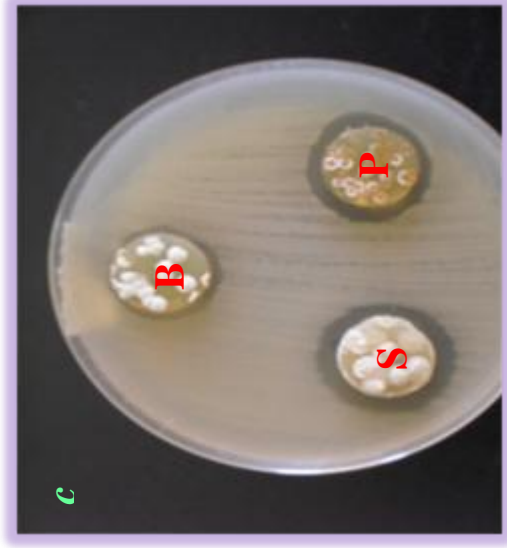
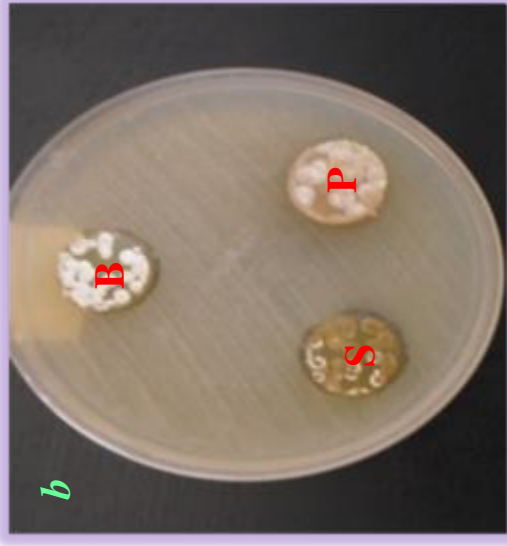
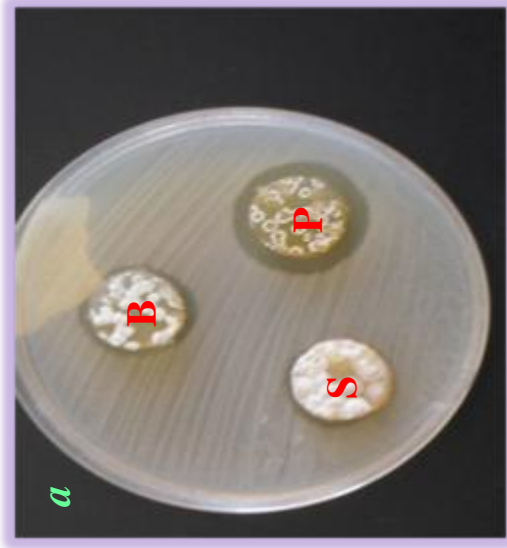


Planche N° 3 : Test d'activité antibactérienne de la souche 21 cultivée sur les milieux gélosés (B) Bennett, (P) PELG et (S) SF contre :
(a) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (b) *Pseudomonas aeruginosa* 13, (c) *Klebsiella pneumoniae* ATCC

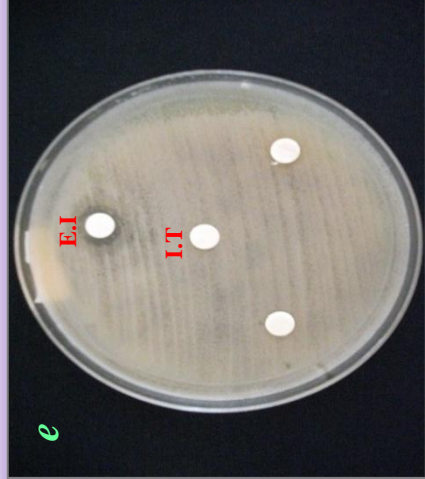
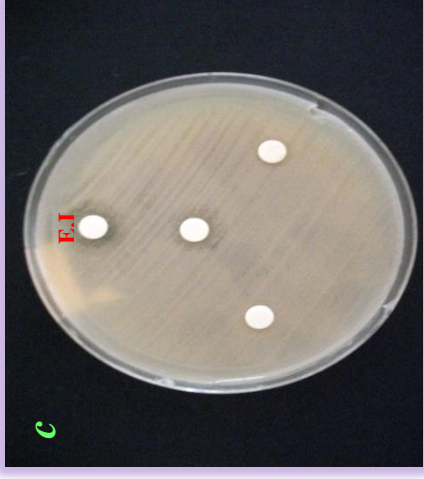
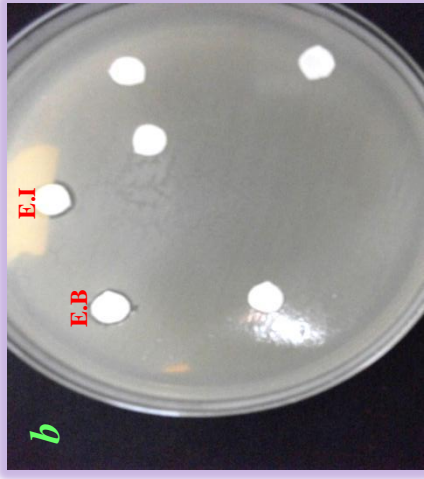
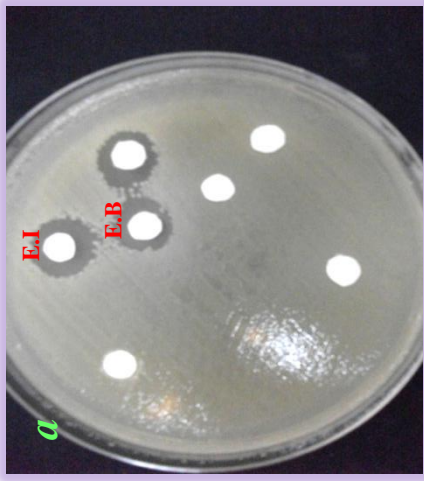


Planche N° 4 : Activité antibactérienne des extraits organiques bruts de la souche 101 envers (a)*Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, et ceux de la souche 21 contre (c) *Pseudomonas aeruginosa* 13, (d) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (e) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (f) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

E.I : Extraits organiques isoamyle acétatiques, **E.C** : Extraits organiques chloroformiques, **E.B** : Extraits organiques butanoliques, **B.T** : Butanol témoin, **C.T** : Chloroforme témoin, **I.T** : Isoamyle acétate témoin.

Pour la souche actinomycétale 21. Aucune activité antibactérienne n'a été détectée à partir des extraits hexanoïques, contrairement aux autres extraits organiques exploités.

Contrairement aux extraits chloroformiques et dichlorométhaniques dont l'activité antibactérienne a été détectée contre les trois bactéries-tests à la fois, les extraits isoamyle acétatiques n'ont inhibé que les deux bactéries à coloration de Gram négative *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 tandis que les extraits butanoliques n'ont inhibé que la bactérie-test à coloration de Gram positive *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (tableau N° 26).

Les plus grands diamètres des zones d'inhibition ont été obtenus par les disques imprégnés des extraits isoamyle acétatiques envers les bactéries-tests *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 (9,33 mm) et *Pseudomonas aeruginosa* 13 (12 mm) (figure N° 10).

Ces résultats font ressortir :

L'isoamyle acétate, le chloroforme et le dichlorométhane comme les meilleurs solvants pour l'extraction des molécules bioactives produites par la souche 21 à partir du milieu gélosé PELG.

L'isoamyle acétate permet l'extraction d'un seul type de molécules bioactives (agissant envers les bactéries-tests à coloration de Gram négative) et en quantité significativement élevée (d'après les diamètres des zones d'inhibition) par rapport à celle des extraits chloroformiques et dichlorométhaniques.

Le chloroforme et le dichlorométhane permettent l'extraction des deux types de molécules bioactives : les molécules à activité antibactérienne anti-Gram positif et celles à activité antibactérienne anti-Gram négatif mais en quantité moins importante que celle obtenue à partir des extraits isoamyle acétatiques.

L'égalité des diamètres des zones d'inhibition produites par les disques imprégnés par les extraits chloroformiques et dichlorométhaniques envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, d'une part, et la supériorité des diamètres des zones d'inhibition produites par les extraits chloroformiques par rapport à ceux des extraits dichlorométhaniques, d'autre part, nous incitent à sélectionner le chloroforme et l'isoamyle acétate pour les exploiter dans la partie V (Identification préliminaire des molécules bioactives produites par les souches 21 et 101).

Tableau N° 26 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques bruts des cultures gélosées de la souche 21 sur le milieu PELG, envers les bactéries-tests

| Solvants organiques | <i>Bactéries-tests</i> | | |
|-------------------------|--|----------------------------------|---|
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| Butanol | - | - | 7 |
| N-hexane | - | - | - |
| Dichlorométhane | 7, 33 | 7, 33 | 8, 66 |
| Chloroforme | 7, 33 | 9 | 8, 66 |
| Isoamyle acétate | 9, 33 | 12 | 12 |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

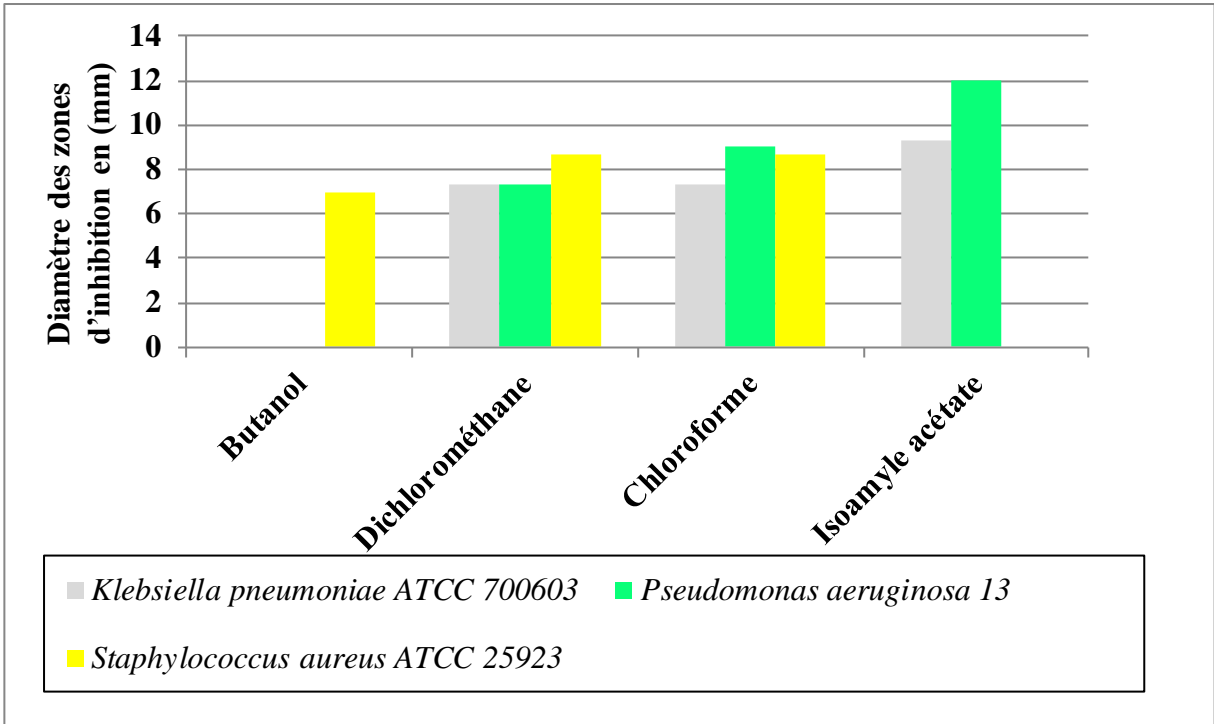


Figure N° 10 : Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche 21 en fonction des solvants organiques et des bactéries-tests

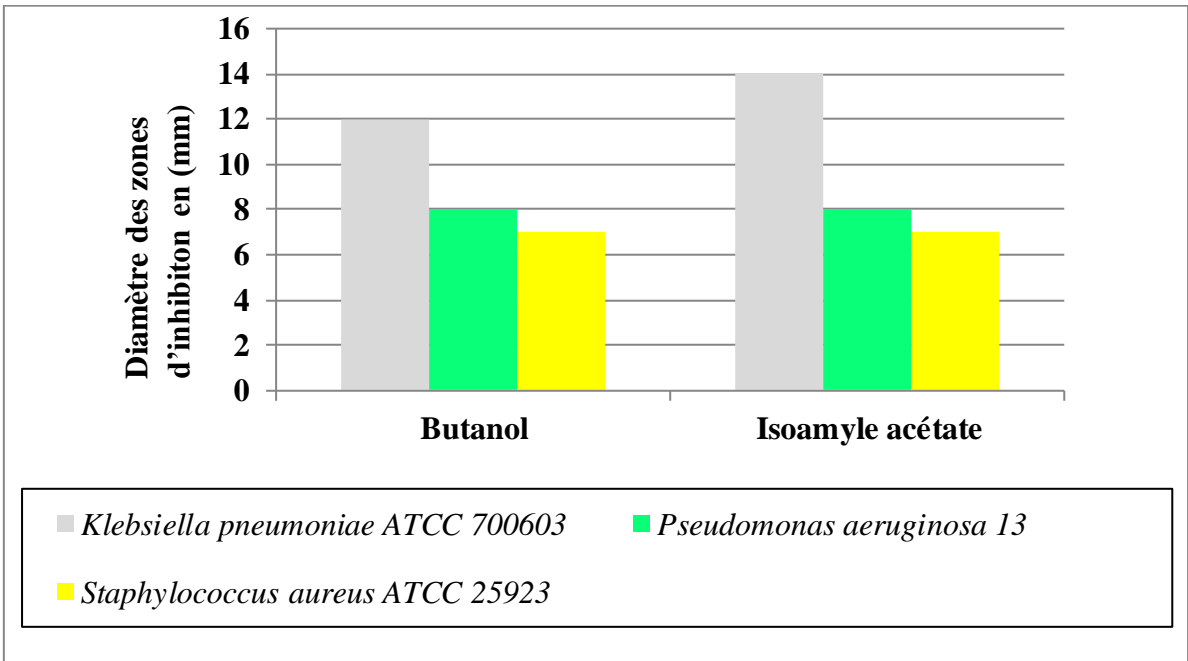


Figure N° 11 : Activité antibactérienne des extraits organiques de la souche 101 en fonction des solvants organiques et des bactéries-tests

Pour la souche 101. Sur les cinq solvants exploités, l'isoamyle acétate et le butanol sont les seuls solvants qui ont permis l'extraction des molécules à activité antibactérienne (figure N° 11).

La plus grande zone d'inhibition a été obtenue, pour les deux solvants, envers *Klebsiella, pneumoniae* ATCC 700603 avec un diamètre de 12 mm pour les extraits butanoliques et 14 mm pour les extraits isoamyle acétatiques (tableau N° 27).

Tableau N° 27: Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques bruts des cultures gélosées de la souche 101 sur le milieu GELM, envers les bactéries-tests

| Solvants organique | Bactéries-tests | | |
|-------------------------|---|----------------------------------|--|
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| Butanol | 12 | 8 | 7 |
| N-hexane | - | - | - |
| Dichlorométhane | - | - | - |
| Chloroforme | - | - | - |
| Isoamyle acétate | 14 | 8 | 7 |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Ces résultats font ressortir l'isoamyle acétate comme le meilleur solvant pour l'extraction des molécules bioactives dans la suite de notre travail.

Le N-hexane est un solvant apolaire, le butanol est un solvant polaire. Le chloroforme, le dichlorométhane et l'isoamyle acétate sont des solvants de polarité intermédiaire. La polarité de chaque solvant est mesurée par sa constante diélectrique (voir annexe N° 3). Ces données chimiques nous permettent de conclure que les deux souches 21 et 101 ne produisent pas des molécules antibactériennes apolaires mais des molécules de polarité intermédiaire et d'autres de polarité élevée.

V/ Caractérisation préliminaire des substances à activité antibactérienne produites par les souches actinomycétales 21 et 101

V-1/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction du pH

Les diamètres des zones d'inhibition engendrées par les différents extraits organiques bruts en fonction du pH des souches actinomycétales 21 et 101 sont rassemblés dans les tableaux N° 28, 29, et 30.

Pour la souche 21. Les molécules antibactériennes des extraits bruts isoamyle acétatiques restent actives à des pH acide. L'activité est optimale à pH = 6 vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et à pH allant de 3 à 4 contre *Pseudomonas aeruginosa* 13, tandis qu'aux pH allant de 7 à 10, elle est nulle.

Concernant les extraits chloroformiques, la stabilité des molécules bioactives est observée dans des conditions plus étroites que celles des extraits isoamyle acétatiques dont la seule activité antibactérienne est observée à l'égard de *Pseudomonas aeruginosa* 13 à pH = 6 et à pH = 9. L'activité est inexistante envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sur toute la gamme du pH testée (tableau N° 28).

Tableau N° 28 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques chloroformiques de la souche actinomycétale 21, envers les bactéries-tests, en fonction du pH

| <i>Bactéries tests</i> | Valeurs de pH testées | | | | | | | | |
|--|-----------------------|---|---|---|----|---|---|----|----|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | - | - | - | - | 11 | - | - | 11 | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Tableau N° 29 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche actinomycétale 21, envers les bactéries-tests, en fonction du pH

| Bactéries tests | Valeurs des pH testées | | | | | | | | | |
|--|------------------------|-------|-------|------|-------|---|---|---|----|---|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - | - | 7,66 | 11,33 | - | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 11,33 | 11,66 | 11,66 | 10 | 11,33 | - | - | - | - | - |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Pour la souche 101. Les molécules antibactériennes des extraits bruts isoamyle acétatiques sont actives envers *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 à pH = 10 et à des pH variant de 2 à 7 vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* 13 dont l'activité est optimale à pH = 5 (tableau N° 30).

Pour *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, les molécules bioactives conservent leur stabilité dans des pH acide allant de 2 à 3, des pH neutres entre 6 et 7 et à pH alcalin (pH = 10).

La comparaison des diamètres des zones d'inhibition des extraits bruts traités (ajustés à différentes valeurs du pH) avec ceux non traités nous permettent de conclure que le pH a un effet significatif sur la stabilité des molécules antibactériennes et donc sur la persistance de leur activité passant d'une bactérie-test à l'autre et d'un extrait organique à l'autre, le diamètre des zones d'inhibition engendrées par les extraits isoamyle acétatiques et chloroformiques de la souche 21 envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 a augmenté presque de deux unités.

Pour la souche 101, le pH a un effet hautement significatif sur l'activité des molécules antibactériennes dont le diamètre des zones d'inhibition des extraits bruts isoamyle acétatiques a augmenté de sept unités (le double du diamètre des zones d'inhibition engendrées par les extraits non traités) envers *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et d'une unité à cinq unités envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 70603 et *Pseudomonas aeruginosa* 13.

Pour la plupart des cas observés, l'activité antibactérienne des souches 21 et 101 est inexistante en milieu très alcalin (pH allant de 8 à 10). Des résultats identiques ont été rapportés par **Reghioua et al., (2008)**.

L'inexistence de l'activité antibactérienne des extraits chloroformiques envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 ne signifie pas qu'elle est absente totalement, elle peut être présente à des pH supérieurs à 10. Des travaux ultérieurs réalisés par **Muiru et al., (2007)** montrant la présence de l'activité antifongique envers *Pythium*spp à des pH allant de 12 à 14.

D'après **Florey et al., (1949)**, un composé qui est soluble dans un solvant organique à pH acide est lui-même acide. Basant sur ces données, on peut conclure que les extraits bruts isoamyle acétatiques de la souche 21 comportent probablement des molécules antibactériennes de nature acide actives envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* 13 tandis que les extraits chloroformiques renferment des molécules de nature chimique acide et basique à la fois actives contre *Pseudomonas aeruginosa* 13.

Les extraits bruts isoamyle acétatiques de la souche 101 comporte probablement des molécules de nature chimique acide, neutre et basique.

Tableau N° 30: Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche 101, envers les bactéries-tests, en fonction du pH

| Bactéries tests | Valeurs des pH testées | | | | | | | | | |
|--|------------------------|-------|---|----|-------|-------|---|------|----|-------|
| | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 8 | 9 | 9 | 13 | 10,66 | 7,66 | - | - | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 13 | 11,33 | - | - | 9 | 10,66 | - | 9,33 | - | - |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | 14,66 |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

V-2/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la température

Les diamètres des zones d'inhibition engendrées par les différents extraits organiques bruts de la souche 21 et 101 après traitement thermique sont rassemblés dans les tableaux N° 31, 32 et 33.

Pour la souche 21. Les molécules antibactériennes des extraits isoamyle acétatiques actives envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et *Pseudomonas aeruginosa* 13 gardent leurs activités après traitement pendant 30 min à 50 °C, 70 °C, 100 °C avec perte de l'activité envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 après congélation à -20 °C (tableau N° 32).

Pour les extraits chloroformiques, les molécules ayant une activité envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 conservent leur activité après traitement thermique à 50 °C, 70 °C, 100 °C et après congélation à -20 °C tandis que les molécules qui avaient une activité vis-à-vis de *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 et de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 perdent leur activité après traitement thermique (tableau N° 31).

Tableau N° 31 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques chloroformiques de la souche 21, envers les bactéries-tests, en fonction de la température, l'obscurité et la luminosité

| Valeurs des températures testées | Bactéries-tests | | |
|----------------------------------|--|----------------------------------|---|
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| -20°C | - | 14 | - |
| 50 °C | - | 8,66 | - |
| 70 °C | - | 10 | - |
| 100 °C | - | 14 | - |
| Obscurité | 7 | 9 | 8 |
| Luminosité | - | 9 | - |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Tableau N° 32 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche 21, envers les bactéries-tests, en fonction de la température, l'obscurité et la luminosité

| Valeurs des températures testées | Bactéries-tests | |
|----------------------------------|--|----------------------------------|
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 |
| -20°C | 9 | - |
| 50 °C | 7 | 12,66 |
| 70 °C | 8 | 8 |
| 100 °C | 9 | 10 |
| Obscurité | 8,66 | 10 |
| Luminosité | 11,33 | - |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Pour la souche 101. Les molécules antibactériennes contenues dans les extraits isoamyle acétatiques préservent leur activité après traitement à 70 °C et 100 °C seulement contre *Pseudomonas aeruginosa* 13, tandis que celles ayant une activité envers *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 préservent leur activité après traitement pendant 30 min à 50 °C seulement.

L'activité est totalement perdue envers *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 après traitement à différentes température (tableau N° 33).

Tableau N° 33 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits organiques isoamyle acétatiques de la souche 101, envers les bactéries-tests, en fonction de la température, l'obscurité et la luminosité

| Valeurs des températures testées | Bactéries-tests | | |
|----------------------------------|--|----------------------------------|---|
| | <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 |
| -20°C | - | - | - |
| 50 °C | 7,66 | - | - |
| 70 °C | - | 7 | - |
| 100 °C | - | 7,33 | - |
| Obscurité | 17,33 | 14,33 | 7 |
| Luminosité | 11,66 | 7 | - |

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Ces résultats nous permettent de conclure que la température à un effet significatif sur la stabilité conformationnelle des molécules bioactives et donc sur la stabilité de leurs activités antibactériennes passant d'une bactérie-test à l'autre et d'un extrait brut à l'autre. De plus, la conservation de l'activité antibactérienne après chauffage de 30 min à 100 °C se traduit par la présence de molécules thermostables dans les extraits bruts des souches 21 et 101 étudiées.

V-3/ Stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la lumière

Les diamètres des zones d'inhibition engendrées par différents extraits organiques bruts des deux souches actinomycétales 21 et 101 sont résumés dans les tableaux N° 31, 32 et 33.

L'unique effet de l'obscurité a été observé avec les extraits bruts isoamyle acétatiques des deux souches d'actinomycètes envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 dont le diamètre des zones d'inhibition a diminué de deux unités pour les extraits isoamyle acétatiques de la souche 21 et a augmenté de neuf unités pour ceux de la souche 101.

L'effet de la lumière se traduit soit par l'absence de l'activité antibactérienne des extraits organiques bruts, soit par la diminution du diamètre des zones d'inhibition à l'exception de celui des extraits isoamyle acétatiques de la souche 21 actifs envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 dont le diamètre a augmenté de deux unités.

V-4/ Spectre UV-Visible des molécules bioactives

Les figures N° 12, 13, et 14 enregistrent respectivement les spectres UV-Visibles des extraits actifs chloroformiques et isoamyle acétatiques de la souche 21 et ceux des extraits actifs isoamyle acétatiques de la souche 101.

La spectrophotométrie qui permet la distinction entre les polyènes et les non-polyènes a été employée par plusieurs auteurs (**Ball et al., 1957; Raghav et Gupta, 1982; Lindenfelser et al., 1964; Kobayashi et Medoff, 1977**).

Les polyènes présentent des spectres caractérisés par une série de pics entre 260-405 nm (**Hamilton-Miller, 1973**). D'après **Lindenfelser et al., (1964)**, les maxima d'absorption exprimés en nanomètre (nm) sont :

Pour les tétraènes : 290 à 291, 303 à 306, et 318 à 320.

Pour les pentaènes : 318 à 324, 333 à 338, et 346 à 358.

Pour les hexaènes : 339 à 341, 356 à 358, 377 à 380.

Pour les héptaènes : 358 à 365, 376 à 380, 399 à 405.

Les spectres UV-Visible des extraits actifs isoamyle acétatiques des souches 21 et 101 montrent l'absence de pics caractéristiques des polyènes dont les maxima d'absorption sont obtenus respectivement à 285 nm pour la souche 21, 255 nm et 315 nm pour la souche 101 tandis que ceux des extraits actifs chloroformiques de la souche 21 présentent un pic caractéristique des tétraènes (290 nm) et un autre pic caractéristique des molécules non polyéniques. Ces résultats nous permettent de conclure que les molécules produites par la souche 101 sont de nature non polyénique. La souche 21 produit des molécules bioactives de nature non polyéniques et d'autres sont de structure non polyénique à la fois.

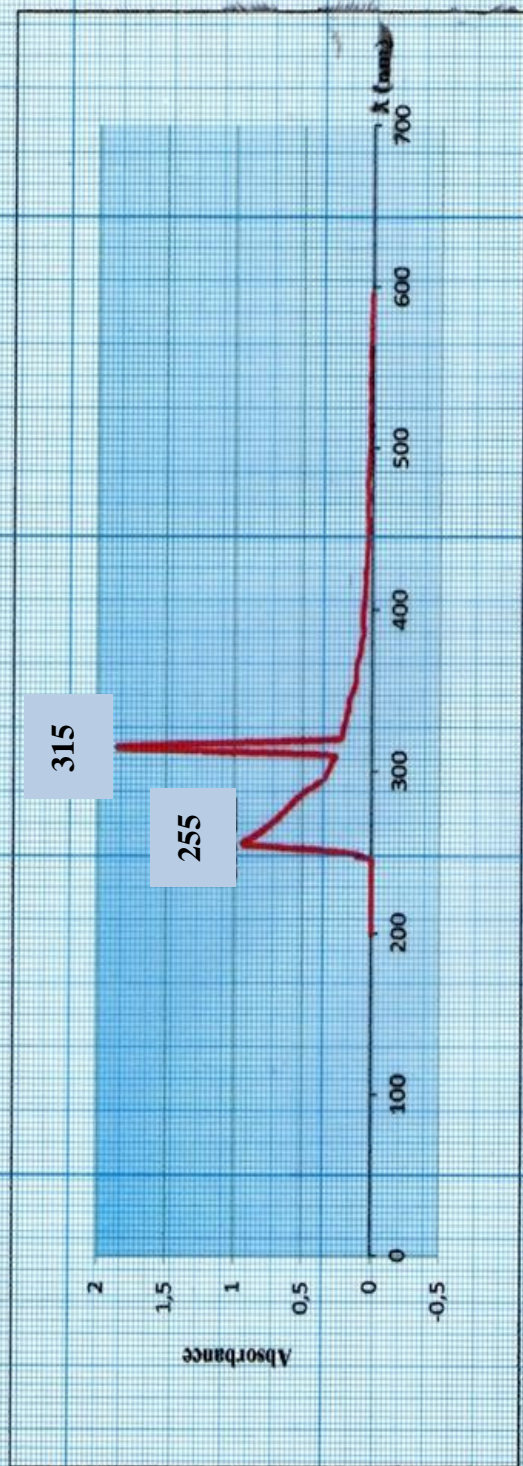


Figure N° 11 : Spectre UV-Visible des extraits actifs isoamyle acétatiques de la souche 101

Figure N° 12 : Spectre UV-Visible des extraits isoamyle acétatiques de la souche 101

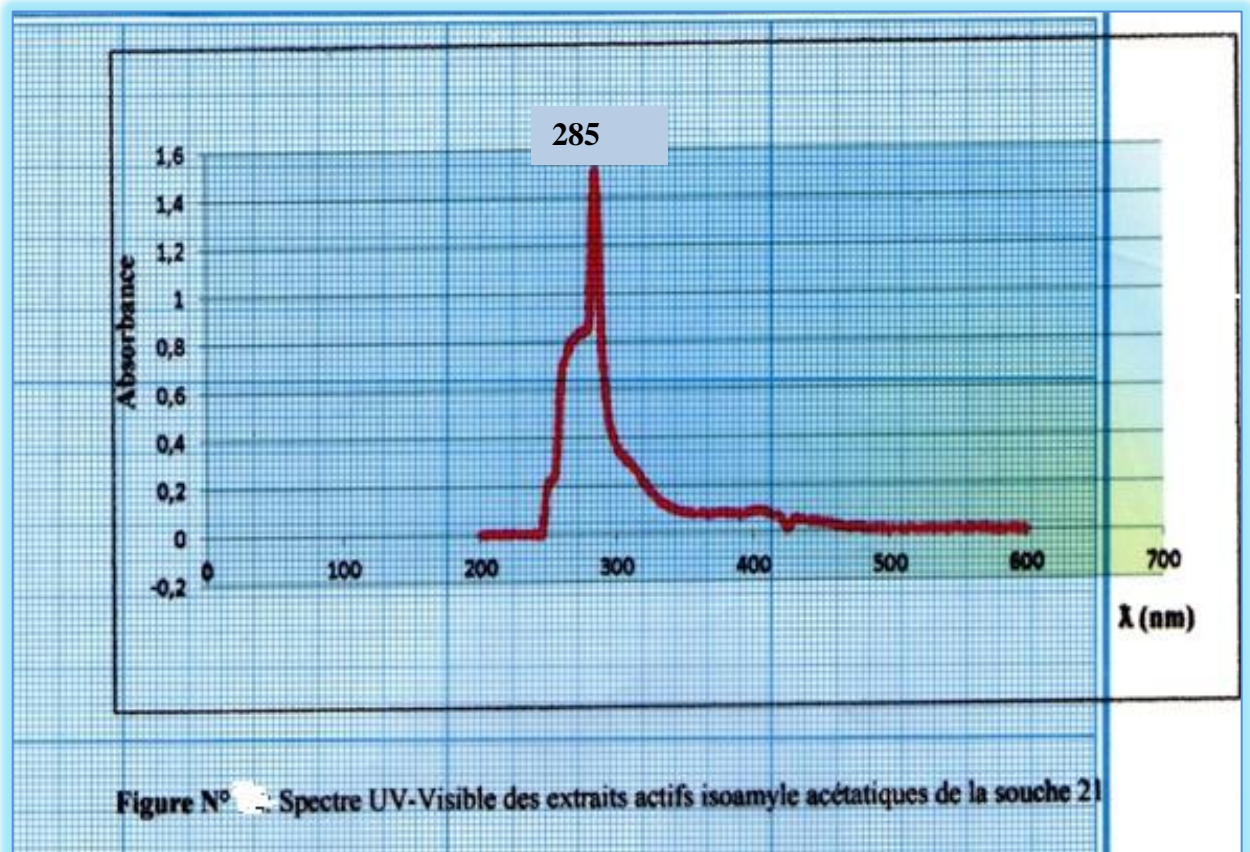


Figure N° 13 : Spectre UV-Visible des extraits actifs isoamyle acétatiques de la souche 21

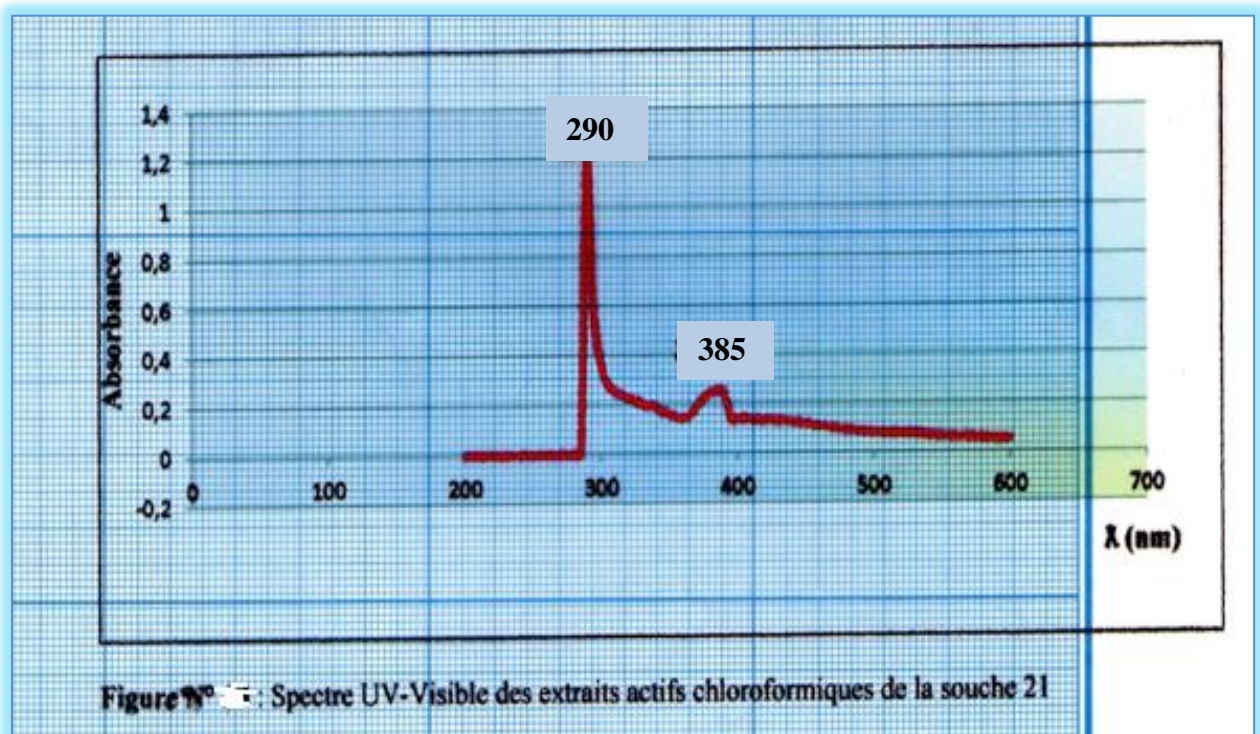


Figure N° 14 : Spectre UV-Visible des extraits actifs chloroformiques de la souche 21

Hamilton-Miller (1973) et **Thomas (1976)** ont montré que la co-production polyène-non polyène est souvent rencontrée chez les actinomycètes.

Les pics ainsi obtenus sont caractéristiques soit d'un seul type de molécules, soit de plusieurs types mais ayant les mêmes caractéristiques spectrales ce qui nous confirme la contenance des extraits actifs bruts de plus d'un type de molécules.

V-5/ Essais de séparation et de caractérisation des molécules bioactives produites par les souches actinomycétales 21 et 101

V-5-1/ Evaluation de l'activité antibactérienne des extraits méthanoliques des souches actinomycétales 21 et 101

Pour la souche 21. Les extraits méthanoliques issus de la concentration des extraits organiques bruts isoamyle acétatiques ne sont actifs qu'envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 tandis que ceux issus de la concentration des extraits organiques bruts chloroformiques sont actifs vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (tableau N° 34).

Tableau N° 34 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits méthanoliques de la souche 21

| <i>Bactéries tests</i> | Les extraits méthanoliques | |
|--|----------------------------|---------|
| | E. M. C | E. M. I |
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | - | - |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 7 | 8 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 7 | 7 |

E. M. C : Extraits méthanoliques issus de la concentration des extraits actifs chloroformiques

E. M. I : Extraits méthanoliques issus de la concentration des extraits actifs isoamyle acétatiques

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

Pour la souche 101. Les extraits méthanoliques issus de la concentration des extraits organiques bruts isoamyle acétatiques ont montré une activité envers les trois bactéries-test (tableau N° 35).

V-5-2/ Chromatographie sur couche mince de silicagel

Les tableaux N° 36 et 37 représentent les résultats de la chromatographie sur couche mince du gel de silice GF₂₅₄ des extraits méthanoliques de la souche 21 et 101.

Pour la souche 21. Les tests des réactions chromogéniques effectués sur les systèmes solvants A. M et B. A. E sont négatifs pour la vanilline. Ces deux mêmes solvants additionnant le système

Tableau N° 35 : Activité antibactérienne en (mm) des extraits méthanoliques de la souche 101

| <i>Bactéries tests</i> | E. M. I' |
|--|-----------------|
| <i>Klebsiella pneumoniae</i> ATCC 700603 | 7 |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 | 8, 33 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923 | 7 |

E. M. I' : Extraits méthanoliques issus de la concentration des extraits actifs
isoamyle acétatiques

* Ces mesures représentent la moyenne des diamètres des zones d'inhibition

solvant E.A.E sont négatifs pour la ninhydrine et positif pour le révélateur des glucides et les cristaux d'iode.

La constante de migration caractéristique de chaque espèce chimique dans un système de phase stationnaire / phase mobile donnée est appelé le rapport frontal.

Par définition, le rapport frontal est égal au rapport entre la distance parcourue par la tache et la distance parcourue par le front du solvant depuis la ligne de dépôt (**Lefebvre, 2008**).

D'après les rapports frontaux pour chaque tache révélée, le système solvant B.A.E est le meilleur système solvant permettant une migration rapide des molécules bioactives et une bonne séparation et donc une bonne purification des extraits méthanoliques. Une grande partie des séparations par CCM fait appel au processus d'adsorption

Pour la souche 101. Les deux systèmes solvants A.M et E.A.E ont montrés des résultats chromogéniques positifs pour la ninhydrine et le révélateur des glucides. Les systèmes solvant B.A.E et A.M sont les seuls systèmes qui ont montré des résultats chromogéniques positifs pour la vanilline et les cristaux d'iode respectivement.

Chaque tache révélée est constituée soit d'un seul type de molécule ou bien un ensemble de molécule ayant le même poids moléculaire et donc la même vitesse de migration.

Les réactions chromogéniques des extraits méthanoliques de la souche 21 ont permis de révéler la présence de résidus éthers, glucidiques et des lipides insaturés. Par contre les résidus aminés sont absents. Le système solvant AM est le meilleur puisqu'il permet une bonne migration et séparation de trois types de molécules

Pour la souche 101, les réactions chromogéniques ont révélées la présence de résidus aminés, glucidiques, d'éther et des lipides insaturés dans les extraits méthanoliques.

Tableau N° 36 : Récapitulatif des résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques E.M.I et E.M.C de la souche actinomycétale 21 et des rapports frontaux des spots révélés

| Les révélateurs chromogéniques | Les extraits méthanoliques | Les systèmes solvants | | |
|--------------------------------|----------------------------|--|----------|-----------------------|
| | | A.M | E.A.E | B.A.E |
| La vanilline | E.M.C | - | - | + (0,52) |
| | E.M.I | - | - | + (0,57) |
| Aspect des spots | | - | - | Spots de couleur rose |
| Révélateur des glucides | E.M.C | - | + 0,64) | - |
| | E.M.I | + (0,68) | + (0,52) | + (0,52) |
| Aspect des spots | | Spots violacées | | |
| Les cristaux d'iode | E.M.C | + (0,94) | + 0,57) | - |
| | E.M.I | 2 spots : Spot 1 : + (0,84) Spot 2 : + | + (0,53) | - |
| Aspect des spots | | Spots jaunes à marron | | |
| La ninhydrine | E.M.C | - | - | - |
| | E.M.I | - | - | - |
| Aspect des spots | | | | |

Tableau N° 37 : Récapitulatif des résultats de la chromatographie sur couche mince des extraits méthanoliques E. M. I' de la souche actinomycétale 101 et des rapports frontaux des spots révélés

| | Les systèmes solvants | | |
|---------------------------------------|------------------------|----------------|------------------------|
| | A.M | B.A.E | E.A.E |
| Les révélateurs chromogéniques | | | |
| La vanilline | - | + (0,62) | - |
| Aspect des spots | | Spots violacés | |
| Révélateur des glucides | + (0,94) | - | + (0,56) |
| Aspect des spots | Spots violacés | - | Spots violacés |
| Les cristaux d'iode | + (0,90) | - | - |
| Aspect des spots | Taches jaunes à marron | | Taches jaunes à marron |
| La ninhydrine | + (0,93) | - | + (0,88) |
| Aspect des spots | Des spots pourpres | | Des spots pourpres |

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Au bilan, les résultats obtenus dans la présente étude montrent que :

Sur les 19 souches actinomycétales testées, 18 souches sont actives envers au moins une bactérie-test et une bactérie actinomycétale n'a pas d'activité antibactérienne détectée envers toutes les bactéries-tests et sur les dix milieux de culture exploités. Les deux souches d'actinomycètes 21 et 101 sont sélectionnées comme les souches les plus productrices d'antibactériens et les milieux de culture PELG et GELM comme les meilleurs milieux de production d'antibactériens respectivement. Vue leur importance en pathologie infectieuses, les bactéries-tests *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, *Pseudomonas aeruginosa* 13, et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 sont sélectionnées comme souches types.

En terme de production des molécules bioactives, les souches d'actinomycètes 21 et 101 montrent une variation de production d'antibactériens en fonction de la température d'incubation, le pH du milieu de culture, et en fonction des bactéries-tests. Ces résultats nous ont permis de conclure parallèlement que les souches d'actinomycètes 21 et 101 sont des souches mésophiles, alkaliphiles.

L'extraction par une batterie de solvants organiques de polarité différente nous a permis, d'une part, de choisir le chloroforme et l'isoamylacétate pour extraire les antibactériens produits par la souche 21 et l'isoamylacétate pour extraire les antibactériens produits par la souche 101, et d'autre part, d'identifier préliminairement la nature chimique de ces molécules bioactives. Basant sur les données chimiques de polarité des solvants organiques, on peut conclure que les antibactériens produits par les souches actinomycétales 21 et 101 peuvent être de polarité élevée et d'autres de polarité intermédiaire.

L'étude spectrale des antibactériens extraits par spectrophotométrie UV –Visible, l'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de plusieurs paramètres physico-chimiques ainsi que la séparation et la caractérisation de ces molécules bioactives par chromatographie sur couche mince du gel de silice, font ressortir que :

Les spectres UV –Visible montrent l'absence de pics caractéristiques des polyènes dans les extraits actifs isoamylacétatiques de la souche 101, tandis que ceux de la souche 21 ont montré la co-production par cette souche de molécules polyéniques et non polyéniques à la fois.

L'étude de la stabilité de l'activité antibactérienne en fonction de la température montre la présence de molécules thermostables dans les extraits actifs des souches 21 et 101 ; l'activité de ces molécules persiste à 70 °C et à 100 °C. Les molécules bioactives contenues dans les extraits actifs de la souche 21 peuvent être de nature chimique acide. Les extraits actifs de la souche 101 renferment des molécules bioactives qui peuvent être de nature acide, neutre, et basique. L'exposition à l'obscurité n'entraîne pas une différence significative sur cette activité comparant avec celle de la lumière.

La séparation par chromatographie sur couche mince de gel de silice à révéler la présence dans les extraits méthanoliques issus de la concentration des extraits actifs des souches 21 et 101 des résidus lipidiques, éthers, et glucidiques additionnant des résidus aminés dans les extraits méthanoliques de la souche 101. Les extraits méthanoliques de la souche 21 issus de la concentration des extraits organiques bruts isoamylacétatiques ne sont actifs qu'envers *Pseudomonas aeruginosa* 13 tandis que ceux issus de la concentration des extraits organiques bruts chloroformiques sont actifs vis-à-vis *Pseudomonas aeruginosa* 13 et *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Les extraits méthanoliques de la souche 101 issus de la concentration des extraits organiques bruts isoamylacétatiques ont montré une activité envers les trois bactéries-test.

La comparaison entre les diamètres des zones d'inhibition engendrées par les cylindres d'Agar de 6 mm et ceux engendrés par les cylindres d'agar de 16 mm nous a permis de conclure que le diamètre des cylindres d'Agar a un effet significatif sur l'apparition des zones d'inhibition et donc sur les résultats de l'activité antibactérienne.

Les perspectives de nos recherches futures sont les suivants :

*Nous comptons identifier complètement les souches d'actinomycètes sélectionnées par études morphologiques -macro et microscopiques, physiologiques, chimio taxonomiques, phylogénétiques, et moléculaire.

*Une approche complémentaire se concentre sur l'évaluation de l'activité antifongique des 19 souches actinomycétales et la sélection des souches les plus productrices d'antifongiques.

*Une piste très intéressante à suivre serait l'optimisation des paramètres cultureux par plan d'expérience afin d'améliorer la production d'antibiotiques.

*Nous projetons de compléter l'identification de la structure chimique complète de chacune de ces molécules bioactives par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques très sensibles et reproductibles, tels que : chromatographie sur papier et bio autographie, chromatographie sur colonne, chromatographie en phase gazeuse, HPLC, spectroscopie – IR, spectroscopie de masse, RMN. De plus, et vue l'importance des activités biologiques secrétées par les deux souches actinomycétales 21 et 101 sélectionnées, une des perspectives la plus immédiates est l'essai in vivo de ces biomolécules.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

-Aboul-Enein A., About elalla F., Serour E., Hussien T. 2010. *International Journal of Academic Research*. **2**: 81-85.

-Aharonowitz Y., Demain A.L. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **14**: 159-164.

-Aoyagi T., Yagisawa M., Kumegai M., Hamada M., Okami Y., Takeuchi T. *et al.*, 2006. An enzyme inhibitor, Panostalin produced by *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*. **24** : 860-869.

-Asanza-Ternuel M. L., Gontier E., Bienaime C., Nava-Saucedo J.E., Barbotin J. N. 1977. Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology*. **21**: 314-320.

-Athlaye M., Goodfellow M., Lacey J., Write R. P. 1985. Numerical classification of *Actinomadura* and *Nocardopsis*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **35**: 86-98.

B

-BadjiB., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharien sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*. **15** : 211-219.

-Balagurunatha R., Radhakrishnon M., Somasundarom S.T. 2010. L-glutaminase Producing Actinomycetes from marine sediments-selective isolation, semi quantitative assay and characterization of potential strain. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. **4**: 698-705.

-Ball S., Bessel C. J., Mortimer A. 1957. The production of polyenic antibiotics by soil streptomycetes. *Journal of General Microbiology*. **17** : 96-103.

-Baniasadi F., Shahidi G.H., Karimi Nik A. 2009. In Vitro Petroleum Decomposition by Actinomycets Isolated from Petroleum Contaminated Soils. *American-Eurasian. Journal of Agricultural and Environmental Science*. **6**: 268-270.

-Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E., Lechevalier H. A. 1964. Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Applied Microbiology*. **12** : 421-423.

-Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *Journal of antibiotics*. **58**: 1-26.

-Bonnet R. 2004. Growing group of extended spectrum β -lactamases: the CTX-M-enzymes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **40**: 1-14.

-Boudmagh A. 2006. Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **128p**.

-Bousseboua H. 2005. Eléments de microbiologie. Publication universitaire Mentouri. Constantine. Algérie. Ch **6** : 155-178.

-Bradford P. A. 2001. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) in the 21st century: Characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. **48**: 933-951.

-Braña A.F., Wolf S., Demain A.L. 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Canadian Journal of Microbiology*. **31** :736-743.

C

-Carle S., Pharm B. 2003. Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. **36**: 25-41.

-Chen Y., Krol J., Sterkin V., Fan W., Yan X., Huang W et al., 1999. New process control strategy used in as rapamycin fermentation. *Process Biochemistry*. **34**: 383-389.

-Cheng J. R., Fang A., Demain A. L. 1995. Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **43**: 1096-1098.

-Conton R., Coque T. M. 2006. The CTX-M β -lactamase pandemic. *Current Opinion in Microbiology*. **9**: 466-475.

-Cortès J., Liras P., Castro J.M., Martin J. M. 1986. Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* exerted on the formation of alpha-aminoadipyl-cysteiny-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *Journal of General Microbiology*. **132** :1805-1814.

-Cotarlet M., Bahrim G.E., Negoita T.G., Stougaard P. 2010. Characterization of Newly Polar Psychrotrophic Streptomyces Isolated from Polar Soils with Cold Adapted Bioremediation Potential. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Oluj Napoca*. **38**: 61-65.

-Courvalin P., Philippon A. 1990. Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale.Medecine-Sciences.Flammation. France. Ch **14** : 332-355.

-Courvalin P., Trieu-Cuot P. 1990. Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale.Medecine-Sciences.Flammation. France. Ch **13**: 316-325.

D

-De Boer E.C., De Dejkhuijzen T.M., Vos P.C.N., Kurth K.H., Schamhart D.H.J. 2000. Immunostimulation in the urinary bladder by local application of *Nocardia rubra* cell-wall skeletons (Rubratin) and *Bacillus Calmette-Guerin* as therapy superficial bladder cancer: A comparative study. *Clinical infectious diseases*. **31**: SUP 3 (65p).

- Decker S. R., Adney W. S., Tood B. 2001. Two novel alkalotolerant dextranases from *Streptomyces anulatus*. *Journal of the American Chemical Society Symposium*. **769**: 222-235.
- Dekleva M.L., Titus J.A. and Strohl W.R. 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peuceticus* in a defined medium. *Canadian Journal of Microbiology*. **31**: 287-294.
- Demain A.L., Dykhuizen L. 2006. Ecology and industrial microbiology. Editorial Overview. *Current Opinion in Microbiology* .**9**: 237-239.
- Desjardin V. 2002. Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. Thèse de Doctorat en Sciences techniques du déchet. **247p**
- Dhungel B., Subedi M., Tiwari K.B., Shrestha U.T., Pokhrel S., Agrawal V.P. 2007. Thermostable glucose isomerase from psychrotolerant *Streptomyces sp.* The *International Journal of Life*. **1**: 6-10.
- Doi.Y., Arakawa.Y. 2007. 16S ribosomal rRNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infection Diseases*. **45**: 88-94.
- Dommergues Y., Mangenot F. 1970. Ecologie microbienne du sol, Masson et Cie. France.
- Dulaney E. L. 1948. Observations on *Streptomyces griseus* II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *The Journal of Bacteriology*. **56**: 305-313.
- Dumenil D., Sanglier J. J. 1989. Physiologie de la production des antibiotiques dans «Biotechnologie des antibiotiques». Masson (Ed). **195-217** pp.

E

- Escalante L., Gonzalez R., Obregon A.M., Sanchez S. 1992. Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *The Journal of Antibiotics*. **45**: 465-469.

F

-Fenical W., Jensen P. R. 2006. Developing a new resource for drug discovery marine actinomycete bacteria. *Nature Chemical Biology*. **2**: 666-673.

-Flardh K, Bruttner M. J. 2009. *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews*. **7**: 36-49.

-Fleurette J. 1990. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences. Flammarion. France. Ch **38**: 773-834.

-Flory H. W., Chain E., Heatly N. G., Jennings M. A., Sanders A. G., Abraham E. P., Florey M. E. 1949. Antibiotics: survey of penicillin, streptomycin, and other antimicrobial substances from fungi, actinomycetes, bacteria, and plants. Vol. 1. Oxford University Press. London.

-Fukunagak K., Misatoto T., Asakawa M. Blastocidin, A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Part I. *Bulletin of the Agricultural Chemical Society of Japan*. **19**: 181-188.

G

-Gazenko S. V., Reponen T. A., Grinshpun S. A., Willeke K. 1998. Analysis of airborne actinomycete spores with fluorescent substrates. *Applied and Environmental Microbiology*. **64**: 4410-4415.

-George S. P., Ahmad A., Rao M. B. 2001. Studies of carboxymethyl cellulose produced by an alkalothermophilic actinomycete. *Bioresources Technology*. **77**: 171-175.

-Gersch D., Roemer W., Bocker H. and Thrum H. 1978. Variations in cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Letters*. **3**: 39-41.

-Gesheva V., Ivanova R., Gesheva R. 2004. Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolides antibiotic by *Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological research*. **160**: 243-248.

-Goodfellow M. 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *Journal of General Microbiology*. **69**: 33-90.

-Grandhimathi R., Arunkumar M., Selvin J., Thangavelu T., Sivaramakrishnen S., Kiran G.S. *et al.*, 2007. Potentiel antimicrobien d'actinomycètes marins associés aux éponges. *Journal of Medical Mycology*. **18**: 16-22.

-Guiraud J. P. 1998. Microbiologie alimentaire. Dunod. France. Partie / B : 79-168.

-Gungi S., Arima K., Beppy T. 1983. Screening of antifungal antibiotics according to activities inducing morphological abnormalities. *Agricultural and Biological Chemistry*. **47**: 2061-2069.

H

-Hamilton-Miller J. M. T. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Advanced in Applied Microbiology*. **17**: 166-196.

-Haslay C., Leclerc H. 1993. Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier TEC &DOC. France.

-Hernandez A., Lopez J. G., Arenas M., Santamaria R., Diaz M., Fernandez J. M *et al.*, 2008. Xylan-binding xylanase Xyl 230 from *Streptomyces avermitilis* cloning characterization and overproduction in solid state fermentation. *International Microbiology*. **11**: 133-141.

-Higgs R. E., Zahn G. A., Gygi J. D., Hilton M. D. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 371-376.

-Horinouchi S. 2002. Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Biosciences*. **7: 2045-2057**.

-Hwang B.K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S. 2001. Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology*. **67: 3739-3745**.

J

-Ikinose Y., Genka K., Koike T., Kato H., Watanabe Y., Mori T et al., 2003. Randomized double-blind placebo stage I squamous-cell lung carcinoma. *Journal of National Cancer Institute*. **95: 605-610**.

-Inoue O. O., Netto W., S., Padilla G., Facciotti M.C.R. 2007. Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology*. **38: 58-61**.

-Isu N.R., Onyeagba R.A. 2002. Basic practicals in Microbiology. 2nd edition. Fasmen Communication, Okigwe. **25-45**.

-Iwami M., Nakayama O., Terano H., Kohsaka M., Aoki H., Imanaka H. 2006. A new immunomodulator, FR-900494: Physico-chemical and biological characteristics. *The journal of Antibiotics*. **40: 612-622**.

J

-Jaradat Z., Dwagreh A., Ababneh Q., Saadoun I. 2008. Influence of culture condition on cellulose production by *Streptomyces sp* (Strain J2). *Biological Sciences*. **1: 141-164**.

-Jayaraman R. 2009. Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and a paradigm shift. *Current Science*. **96: 1475-1482**.

-Jinenez J. T., Sturdikova M., Sturdik E. 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca*. **2**: 63-74.

K

-Kang J. H., Kondo.F. 2004. *Streptomyces sp* strain isolated from river water has high bisphenol A degradability. *Letters in Applied Microbiology*. **39**: 178-180.

-Kano K., Matsuo Y., Adashi K. 2005. Mechercharmycin A et B cytotoxic substance from marine derived *Thermoactinomyces sp*. YM3- 251. *The Journal of Antibiotics*. **58**: 289-92.

-Khamna S., Yokota A., Peberdy J.F., Lumyong S. 2010. Indole-3-acetic acid production by *Streptomyces sp* isolated from some Thai medicinal plant rhizospheres soil. *EurAsian Journal of BioSciences*. **4**: 23-32.

-Khan M. R., Saha M. L., Zuha S. B. 2008. Bacteria and actinomycetes growing on floppy and compact discs under ambient conditions. *Bangladesh Journal of antibiotics*. **37**: 7-14.

-Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi L., Reghioia S., Boughachiche F., Zerizer H *et al.*, 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal of Medical Mycology*. **15**: 45-51.

-Kitouni M. 2007. Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **170p**

-Kobayashi G. S., Medoff G. 1977. Antifungal agents. Recent developments. *Annual Review of Microbiology*. **31**: 291-308.

-Komatsu K., Tsuda M., Tanaka Y., Mikami Y., Kobayashi J. 2005. SAR studies of Brasilicar for immunosuppressive and cytotoxic activities. *Bioorganic Medicinal Chemistry*. **13**: 1507-13.

-Korkmaz H., Unaldi M.N., Aslan B., Coral G., Arican B., Dinçer S. *et al.*, 2003. Keratinolytic activity of *Streptomyces* Strain BA7 a new isolate from Turkey. *Annals of Microbiology*. **53: 85-93**.

-Kwon H.C., Kauffman C. A., Jensen P.R. 2006. Marinomycins a-d, antitumor antibiotics of a new structure class from a marine actinomycete of the recently discovered genus *Marinospora*. *Journal of the American Chemical Society*. **128: 1622- 1632**.

L

-Lakshmiathy D.T., Krishnan K. 2009. A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. *International Journal of Integrative Biology*. **6: 132-136**.

-Larpent J. P., Larpent-Gourgaud M. 1990. Mémento Technique de Microbiologie. TEC & Doc-Lavoisier. France.

-Larpent J. P. 2000. Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux groupes bactériens. Lavoisier. France. **4 : 183-212**.

-Lebrihi A., Lefebvre G., Germain P. 1988. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **28 : 44-51**.

-Lebrihi, A., Lamsaif, D., Lefebvre, G. and Germain, P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Applied Microbiology And Biotechnology*. **37 : 382-387**.

-Lechevalier M. P., Lechevalier H. A. 1970. Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In* : The actinomycetales. Prauser H. (eds) Jemu F. V. **311-316**.

- Lechevalier M. P., De Bievre C., Lechevalier H. A. 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: Phospholipid composition. *Biochemical Systematics and Ecology*. **5**: 249-260.
- Lee D. G. 2006. Genomic analysis reveals that *Pseudomonas aeruginosa* virulence in combinatorial. *Genome Biology*. **7**. R90.
- Le Minor L., Véron M. 1990. Bactériologie médicale. Médecine-Sciences Flammarion. France.
- Leveau J. Y., Bouix M. 1993. Microbiologie industrielle. Ch 6: **425-481**.
- Levy S. B., Marshall B. 2004. Antibacterial resistance. Worldwide causes, challenges and responses. *Nature Medicine*. **10**: 122-129.
- Li Q-Q., Meng X-Y., Wu X., Lin W., Duan C-J., Feng J-X et al., 2006. Purification of two antimicrobial substances produced by *Bacillus subtilis* strain B11 and their properties. *Agricultural Sciences in China*. **5**: 363-369.
-
- Lindenfelser L. A., Shotwell O. L., Bachler M. J., Shanon G. M., Pridham T. G. 1964. Antibiotics against plant disease VIII. Screening for nonpolyenic antifungal antibiotics produced by streptomycetes. *Applied Microbiology*. **12**: 508-512.
- Liu S., Liu S. Y., Lu Z. X. 2007. Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese Journal of Biotechnology*. **23**: 1077-1081
- Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G., Germain P. 1995. Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*. **31**: 304-311.

-Lozniewski A., Rabaud C. 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prevention du risqué infectieux. Centre de Coordination de lute contre les infections Nosocomiales-Sud Est.

M

-Madigan M. T., Martinko. J. M., Prker J. 1997. Biology of microorganisms. Prentice Hall International (Ed).

-Malet-Gason L., Romero F., Espliego-Vazquez F., Gravalos D., Fernandez-Puentes J.L. 2009. IB-00208, anew cytotoxic polycyclic xanthone produced by a marine-derived *Actinomadura*. *The journal of Antibiotics*. **56: 219-225**.

-Mane U.V., Deshmukh A.M. 2009. Chitin degrading potential of three aquatic actinomycetes and its optimization. *African Journal of Biotechnology*. **23: 6617-6620**.

-Mariat F., Sebald M. 1990. Actinomycétales..In:Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences. Flammarion. France. Deuxième partie : **933-999**.

-Martín J.F., Demain A.L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiology Reviews*. **44: 230-251**.

-Maskey R.P., Helmke E., Kayser O., Feibig H.H., Maier A., Bushe A *et al.*, 2004. Anti-cancer and antibacterial trioscacarcins with high anti-malaria activity from a marine streptomycete and their absolute stereochemistry. *The Journal of Antibiotics*. **57: 771-779**.

-Mazodier J. 1974. Sociétés industrielles et dechets solides. *Sciences et Vie*. **106: 109-115**.

-Mellouli L., Karray-Rebai I., Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili B., Bejar S. 2004. Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology*. **49: 400-403**.

-Mesbah S. 2009. Sur le front des emergences. *Medecine Tropicale*. **69: 27-32**.

-Minikin D. E., Patel P. V., Alshanaony L., Goodfellow M. 1977. Polar lipid composition in the classification of Nocardia and related bacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*. **27**: 104-7.

-Muiru W., Mutitu E. W., Mukunya D. M. 2007. Characterization of antibiotic metabolites from actinomycetes isolates. *African Crop Science Conference Proceedings*. **8** : 2103-7.

-Mukai A., Fukai T., Matsumoto Y., Ishakawa J., Hoshino Y., Yazawa K *et al.*, 2006. Transvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicylic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *The Journal of Antibiotics*. **59**: 366-9.

-Mukhtar T. A., Koteva K. P., Hughes D. W., Wright G.D. 2001. Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism, not hydrolysis. *Biochemistry*. **40**: 8877-86.

N

—— -Nanjwad B., Chandrashehara S., Goudanavar P. S., Shamarez A. M., Manvi F. 2010. Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **9**: 373-377.

-Neeno-Eckwall E., Kinnel L., Schottel J. 2001. Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian Journal of Microbiology*. **47**: 332-340.

-Nemoto A., Hoshino Y., Yasawa K, Ando A., Mikami Y., Komkaki H *et al.*, 2002. Asterobactin, a new siderophore group from *Nocardia asteroides*. *The Journal of Antibiotics*. **55**: 593-7.

-Noyal M.J., Belgode N.H., Sujatha S., Devinder M.T., Subhash C.P. 2010. *Streptomyces* bacteremia in a patient with actinomycotic mycetoma. *Infect Dev Ctries*. **4**: 249-252.

O

-Omura S., Tanaka J. 1986. Biosynthesis of tylosine and its regulation by ammonium and phosphate. *In*: Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G (Eds), Regulation of secondary metabolites. VCH Publishers Inc. Berlin. **306-332pp.**

-Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H *et al.*, 2006. Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics*. **32: 255-261.**

-Oulmi L. 2004. Identification d'actinomycetales isolés des eaux et de sol de sebkha. Optimisation des milieu de culture de sporulation et de croissance. Mémoire de Magistère en Biochimie et Microbiologie Appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **84p.**

-Pelmont J. 2005. Biodégradation et Métabolisme. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences. France.

——— -Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A. 2003. Microbiologie. De Boeck & Larcier. France

-Pullen C., Schmitz P., Meuer K., Bamberg D. D., Lohman S., De Castro França S *et al.*, 2002. New and bioactive compounds from *Streptomyces* strain residing in the wood of Celastraceae. *Planta*. **16: 162-167.**

Parson J., Patton S. 1967. Two dimensional thin layer chromatography of polar lipids from milk and mammary tissue. *Journal of lipid research*. **8: 696-698.**

R

-Raghav P., Gupta J. S. 1982. Studies on concurrence of polyenic antibiotics by soil streptomycetes. *Acta botanica indica*. **10: 306-7.**

-Rawashdah R., Saadoun I., Mahashneh A. 2005. Effect of cultural conditions on xylanase production by *Streptomyces* sp. (strain Ib24D) and its potential to utilize tomato pomace. *African Journal of Biotechnology*. **4**: 251-5.

-Reghiuoa S., Boughachiche F., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A *et al.*, 2008. Separation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycètes isolé de sol aride de la région de Biskra. *Sciences & Technologie*. C- N°28. **59-64 pp.**

-Reponen T.A., Gazenko S. V., Grinshpun S. A., Willeke K., Cole E. C. 1998. Characteristics of airborne actinomycete spores. *Applied Environmental Microbiology*. **64**: 3807-12.

S

-Sabaou N., Boudjella H., Bendji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L *et al.*, 1998. Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques d'antibiotiques. *Secheresse*. **9**: 147-153.

-Saffroy S. 2006. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France. **150 p.**

-Saleem Basha N., Rekha R., Komala M., Ruby S. 2009. Production of Extracellular Anti-leukaemic Enzyme L-asparaginase from marine Actinomycetes by solid-state and submerged fermentation: Purification and Characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. **8**: 353-360.

-Sanasam S., Ningthoujam D.S. 2010. Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian Journal of Biotechnology*. **2**: 139-145.

-Sanchez S., Demain A. L. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology*. **31**: 895-906.

- Sanglier J. J et Trujilo M. 1997. Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de selection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* **12.** (13).
- Schmitzer P.R., Graupner R.R., Chapin E.L., Fields S.C., Gilbert J.R., Gray J.A *et al.*, 2000. Ribofuranosyl Adenylosuccinate Synthetase Following Phosphorylation. *Natural Products.* **63: 777-781.**
- Seoane A., Garcia-Lobo J.M. 2000. Identification of a streptogramin A acetyl transferase gene in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy.* **45: 905-9.**
- Shapiro S., Vining, L.C. 1985. Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous culture. *Canadian Journal Microbiology.* **31: 119-123.**
- Singh L. S., Mazumder S., Bora T. C. 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale.* **19: 225-233.**
- Singleton P. 1994. Bactériologie. Masson. France
- Simon P., Meunier R. 1970. Microbiologie industrielle et génie biochimique. Masson ETC éditions. France.
- Smaoui S. 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. **251p.**
- Smati F., Laouar H., Khalifa F., Bentchouala C., Hacini A., Lezzar A. 1994. Résistance à la pénicilline G de *Streptococcus pneumoniae* responsable d'infections graves communautaires en Algérie. *Medecine des Maladies Infectieuses.* **24: 1190-2.**

-Stackbrandt E., Geobel B. M. 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic of Bacteriology*. **44**: 846-9.

-Strub C. 2008. Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. **174p**.

-Sturdikova M., Sturdik E. 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Chgimica Slovaca*. **2** : 63-74.

-Suganito M., Roderick S. L. 2002. Crystal structure of Vat D: an acetyl transferase that inactivates streptogramin A group of antibiotics. *Biochemistry*. **41**: 2209-16.

-Sujatha P., Bapi-Raju K. V. V. S. N., Ramana T. 2005. Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiological Ressources*. **160**: 119-126.

-Summers A. O. 2006. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotics multi resistance problem. *Animal Biotechnology*. **17**: 125-135.

T

-Takahashi Y., Omura S. 2003. Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *Journal of Genetic Applied Microbiology*. **49**: 141-154.

-Tanaka Y. 1992. Fermentation processes in screening for new bioactive substances, dans «The search for bioactive compounds from microorganisms» **303-325** pp. Springer-Verlag, New York, (Ed).

-Theilleux J. 1993. In Levreau J. Y., Bouix M. O. Microbiologie industrielle, Les micro-organismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch **6** : 425-481.

-Thomas A. H. 1976. Analysis and assay of polyene antifungal antibiotics. *A review*. *The analyst*. **101**: 321-340.

-Tortora G.J., Funke B. R., Case C. L. 2003. Introduction à la Microbiologie. Editions du Renouveau Pédagogique. France.

-Tortorano A. M., Cabrini E., Viviani M. A. 1979. Sensibilité in vitro des levures à cinq antifongiques. Comparaison de deux methods C. M. I en gélose et method des disques. **Bull. Soc. Fr. Myc. Med.** **8: 69-74.**

-Thumar J. T., Singh S. P. 2007. Secretion of an alkaline protease from a salt-tolerant and alkaliphilic *Streptomyces clavugerus* strain Mit-1. **Brazilian Journal of Microbiology.** **Vol 38.**

-TrystramI D., Varon E., Péan Y., Grundmann H., Gutmann L., Jarlier V et Aubry-Damon H., (2004). Réseau européen de surveillance de la résistance bactérienne aux antibiotiques (EARSS): résultats 2002, place de la France. BEH; **32-33, 142-144.**

U

-Untrau S., Lebrihi A., Lefebvre G., Germain P. 1994. Nitrogen cataboliteregulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. **Current Microbiology.** **28: 111-118.**

——— -Uyeda M., Mizukami M., Yokomizo K., Suzuki K. 2001. Pentalenolactone I and hygromycine A, immunosuppressants produced by *Streptomyces filipinensis* and *Streptomyces hygroscopicus*. **Bioscience Biotechnology Biochemistry.** **65: 1252-4.**

V

-Van Soulinger P., Meyer D., Van Der Kley W. A., Barnett C., Bolle R., Power S. D *et al.*, 2001. Cloning and expression of an endocellulase gene from a novel streptomycete isolated from an East African soda lake. **Extremophiles.** **5: 333-341.**

-Véron M. 1990. Pseudomonaceae. *In* : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences.Flammation. France. Ch **22: 555-587.**

-Vino S., Lokesh K.R. 2008. Borrelidin: A promising anticancer agent from *Streptomyces* species. **Journal of advanced Biotechnolog Reviews.** **22-26.**

-Vitale L. 1999. Aminopeptidase of the Genus *Streptomyces*. **Food Technology and biotechnology.** **37: 29-37.**

W

- Waksman S. A., Henrici A. T. 1943. The nomenclature and classification of the actinomycetes. *The Journal of Bacteriology*. **46: 337-341.**
- Walsh C., Trauger J., Courvalin P., Davies J. 2001. Adapté à partir du poster des mechanisms d'action et de la résistance aux antibiotiques. Trends *In* Microbiology, the Lancet Infectious Diseases, *Current Opinion in Microbiology*, Trends *In* Molecular Medecine.
- Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kurznetsov V. D., Le Monnier F. J *et al.*, 1993. Detection and identification of novel actinomycetes. *Ressources of Microbiology*. **144: 653-656.**
- Williamson N. R., Fineran C. P., Leeper F.j., Salmon P. C. 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review*. **Vol 4.**
- Wright G. D. 2007. The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Rev. Microbial*. **5: 175-186.**

Y

- Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghreb*. N° **91.**

Z

- Zait H., Madani K., Abed-Benamara M., Achir I., Hamrioui B. 2008. Les mycétomes en Algérie. *Journal de Mycologie Médicale*. **18: 116-122.**
- Zbinovski V., Hausman W. K., Wetzel E. R. Q., Borders D. B., Patterson E. L. 1968. Isolation and characterisation of antibiotic LL-AC541. *Applied Microbiology*. **16: 614-6.**
- Zeman F. 2008. Etude des caracteristiques culturelles des actinomycètes implqués dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire de Magistere en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **126p.**

Annexes

Annexe N° 1

Composition des milieux de culture utilisés pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne

Milieu AF

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de Malt | 10g |
| Extrait de levure | 4g |
| Glucose | 2g |
| NaCl | 2,5g |
| CaCO ₃ | 1g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,0

Milieu de Bennett

| | |
|-------------------|---------|
| D-Glucose anhydre | 10g |
| Casaminoacides | 2g |
| Extrait de levure | 1g |
| Extrait de viande | 1g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,3

Milieu CPC

| | |
|---------------------------------------|---------|
| Casaminoacides | 1g |
| Peptone | 2g |
| K ₂ HPO ₄ | 1g |
| KCl | 0,5g |
| MgSO ₄ . H ₂ O | 0,5g |
| FeSO ₄ . 7H ₂ O | 0,01g |
| Glucose | 30g |
| Agar | 20g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7

Milieu GBA

| | |
|-------------------|---------|
| Glycérol | 20g |
| Amidon soluble | 20g |
| Peptone | 10g |
| Extrait de viande | 5g |
| CaCO ₃ | 3g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,0

Milieu GELM

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de Malt | 10g |
| Extrait de levure | 4g |
| Glucose | 4g |
| Agar | 20g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,2

Milieu GLM

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de Malt | 3g |
| Extrait de levure | 3g |
| Peptone | 5g |
| Glucose | 10g |
| Agar | 20g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,2

Milieu ISP2

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de levure | 4g |
| Extrait de Malt | 10g |
| D-Glucose | 4g |
| Agar | 20g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,3

Milieu NPH

| | |
|-------------------|---------|
| Extrait de Malt | 2g |
| Extrait de levure | 4g |
| Glucose | 4g |
| NaCl | 0,5g |
| CaCO ₃ | 1g |
| Agar | 15g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 7,0

Milieu PELG

| | |
|-------------------|---------|
| Peptone | 5g |
| Glucose | 10g |
| Extrait de levure | 2g |
| Agar | 20g |
| Eau distillée qsp | 1000 ml |

pH = 6,8 - 7

Milieu SF

| | |
|---------------------------------|---------|
| Glycérol | 25 g |
| Extrait de levure | 10 g |
| Péptone | 5 g |
| NaCl | 2 g |
| CaCO ₃ | 3 g |
| K ₂ HPO ₄ | 0,25 g |
| MgSO ₄ | 0,5 g |
| Agar | 20 g |
| Eau distillée | 1000 ml |

pH = 7,0

Milieu Muller-Hinton

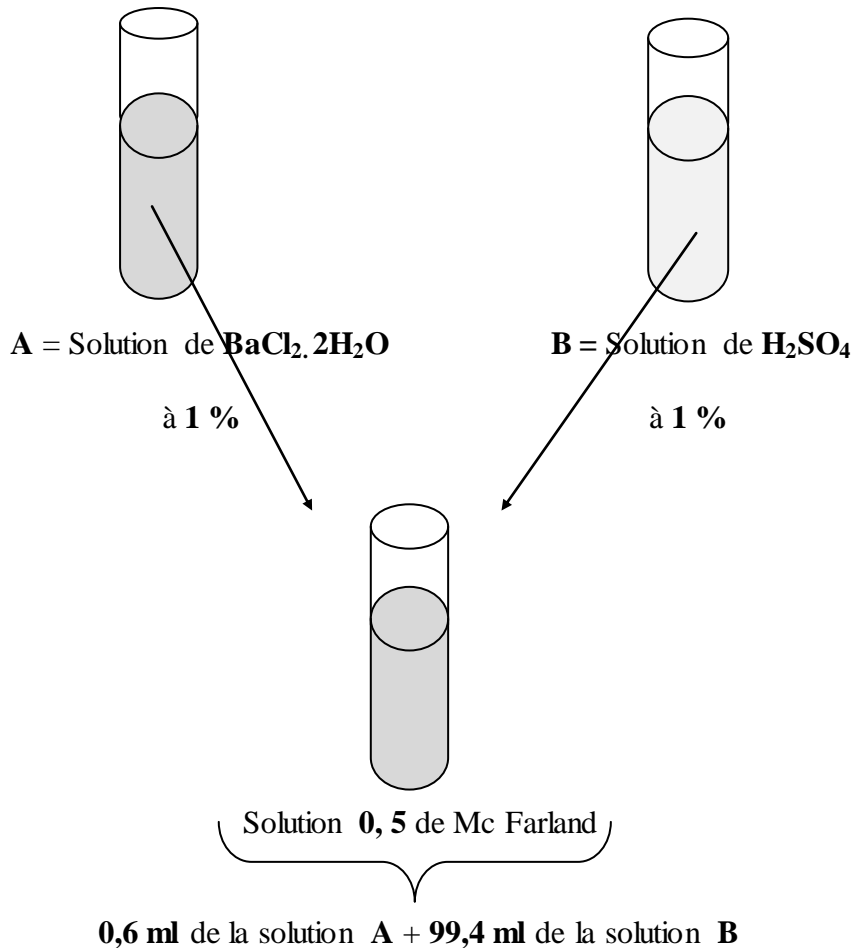
| | |
|------------------------|--------|
| Infusion de viande | 300 g |
| Hydrolysate de caséine | 17,5 g |
| Amidon | 1,5 g |
| Agar | 17 g |

pH = 7,4

Annexe N° 2

Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland

1/ Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland (Chessbrough, 2000)



2/ Conditions de conservation de la solution 0,5 de Mc Farland (Smibert et Kreig, 1994)

Conditions de conservation de la solution 0,5 de Mc Farland

1/ à l'obscurité

2/ Température de conservation : 20-25 °C

3/ Durée de conservation : 6 mois

Annexe N° 3

Tableau N° 38 : Quelques propriétés physico-chimiques des solvants organiques utilisés dans notre travail

| | Solvants organiques | | | | | | |
|--------------------------------------|---|---------------------------------|-----------------------|---|--|-----------------------|--|
| | n-Hexane | Dichlorométhane | Chloroforme | Isoamyle | n-Butanol | Méthanol | |
| Formule chimique | CH ₃ (CH ₂) ₄ CH ₃ | CH ₂ Cl ₂ | CHCl ₃ | C ₇ H ₁₄ O ₂ | CH ₃ (CH ₂) ₃ OH | CH ₃ OH | |
| Masse molaire ¹ | 86,177 | 84,933 | 119,378 | 130 ?186 | 74,122 | 32,042 | |
| Densité ² | 0,65484 ₂₅ | 1,31678 ₂₅ | 1,47970 ₂₅ | 0 ?8719 ₂₅ | 0,80575 ₂₅ | 0,78637 ₂₅ | |
| Point d'ébullition ³ | 68,736 | 39,64 | 61,178 | 149, 2 | 117,725 | 64,546 | |
| Tension de vapeur ⁴ | 20,17 ₂₅ | 58,10 ₂₅ | 25,97 ₂₅ | 1,29 ₂₅ | 0,910 ₂₅ | 16,937 ₂₅ | |
| Cahaleur de vaporisation | 31,552 ₂₅ | 28,56 ₂₅ | 33,35 ₂₀ | 41,0 ₁₄₉ | 52,34 ₂₅ | 37,43 ₂₅ | |
| Taux d'évaporation ⁶ | 6,82 | 14,50 | 10,20 | 0,40 | 0,44 | 2,10 | |
| Viscosité ⁷ | 0,2942 ₂₅ | 0,42 ₂₅ | 0,5357 ₂₅ | 0,862 ₂₅ | 2,5710 ₂₅ | 0,5531 ₂₅ | |
| Tension superficielle ⁸ | 17,94 ₂₅ | 27,33 ₂₅ | 26,53 ₂₅ | 25,07 ₂₅ | 23,35 ₂₅ | 22,30 ₂₅ | |
| Δd ⁹ | 15,0 | 18,2 | 17,8 | 15,7 | 16,0 | 15,1 | |
| Δp | 0,0 | 6,4 | 3,1 | 3,3 | 5,7 | 12,3 | |
| δh | 0,0 | 6,2 | 5,7 | 6,8 | 15,8 | 22,3 | |
| Indice Kb | 30,5 | 136 | - | - | - | - | |
| Constante diélectrique ¹⁰ | 1,8799 ₂₅ | 8,93 ₂₅ | 4,806 ₂₀ | 4,75 ₂₀ | 17,51 ₂₅ | 32,66 ₂₅ | |
| Point d'éclair | -22 | - | 16 | 16 | 37 | 11 | |

Propriétés physico-chimiques

1. Masse molaire relative, sans unité.
2. g. cm³. La température de référence est indiquée en °C en indice
3. °C à 1 atm.
4. KPa. La température de référence est indiquée en °C en indice.
5. Kj/mol. La température de référence est indiquée en °C en indice.
6. Acétate de butyl normal. = 1 à 25 °C, sans unité.
7. Centipoise. (cP). La température de référence est indiquée en °C en indice.
8. dyne. Cm⁻¹. La température de référence est indiquée en °C en indice.
9. Paramètres de solubilité de Hansen en (J. cm⁻³). Δd = composante de dispersion, δp = composante polaire, δh = composante de liaison hydrogène.
10. Sans unité. La température de référence est indiquée en °C en indice.



Planche N° 5 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu GBA contre : (a, b et f) *Enterococcus sp 43*, (c) *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, et sur le milieu ISP2 contre : (e et g) *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603* par la technique des cylindres d'Agar



Planche N° 6 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu NPH contre : (a) *Staphylococcus aureus* 118, (b) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (c) *Enterococcus* sp 43 et sur le milieu ISP2 contre : (d, e et f) *Pseudomonas aeruginosa* 13, (g) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (h) *Enterococcus* sp 43, (i) *Staphylococcus aureus* 118 par la technique des cylindres d'Agar



Planche N° 7 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu PELG contre : (a et c) *Pseudomonas aeruginosa* 13,
 (b) *Salmonella Heidelberg* 1071, (d)*Enterococcus* sp 43, (e) *Staphylococcus aureus* 118, (f et h) *Serratia marcescens* 66,
 (g) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603 par la technique des cylindres d'Agar

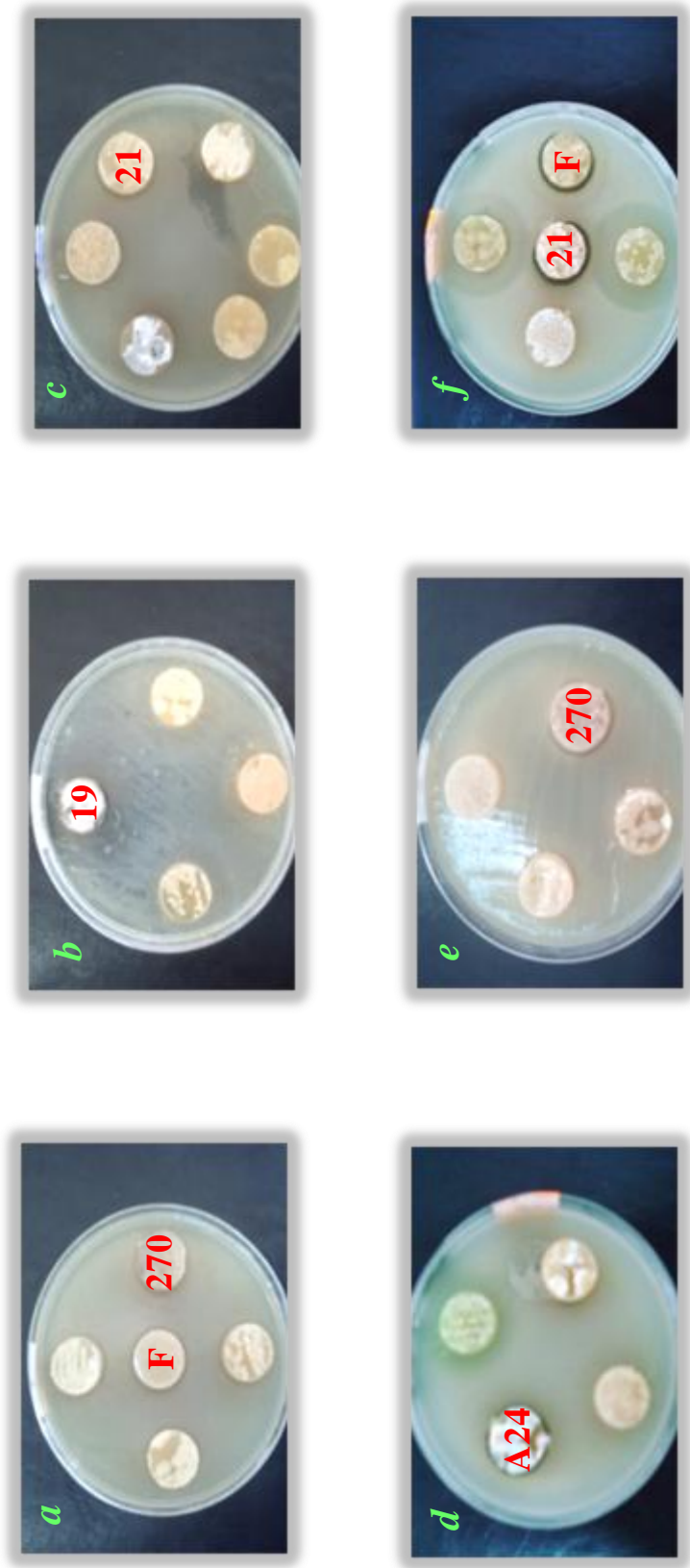


Planche N° 8: Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu SF contre : (a) *Pseudomonas aeruginosa* 13, (b) *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, (c) *Enterococcus* sp 43, (d et f) *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, (e) *Serratia marsecens*66 par la technique des cylindres d'Agar

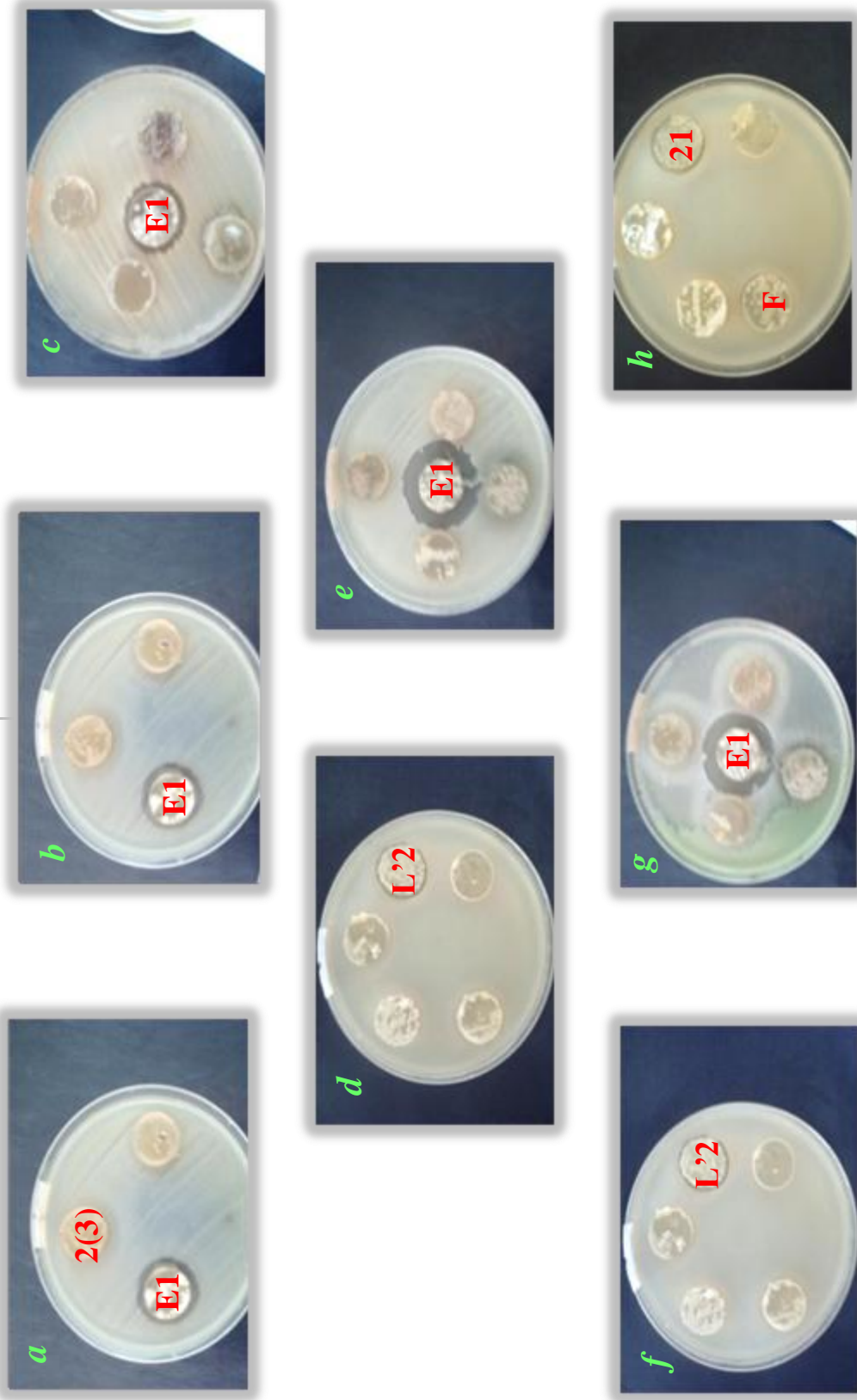


Planche N° 9 : Test d'activité des souches actinomycétales cultivées sur le milieu CPC contre : (a, b et h) *Enterococcus sp 43*, (c) *Staphylococcus aureus 118*, (d, e et f) *Staphylococcus aureus ATCC 25923*, (g) *Klebsiella pneumoniae ATCC 700603* réalisé par la technique des cylindres d'Agar

Annexe N° 5
Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince

| Révélateur chimique | Mose préparatoire | Molécules chimiques révélées | Conditions de révélation | Références |
|----------------------------|--|---|---|-----------------------------------|
| Vanilline | 3 % vanilline, 1,5 % acide sulfurique, éthanol à 95 % | Les éthers | 110 °C pendant 3-5 min | Geshva <i>et al.</i>, 2004 |
| Ninhydrine | Exemple. Préparation d'une solution de 0,3 % de ninhydrine. 0,3 g ninhydrine, 100 ml n-butanol, | Molécules portant des résidus amines (primaires et secondaires) | 80 °C pendant 10 min | Li <i>et al.</i>, 2006 |
| Cristaux d'iode | Une cuve en verre hermétique Préalablement saturée par les vapeurs des cristaux d'iodes | Les lipides | Jusqu'à l'apparition des taches jaunes-marron | Parsons et Pattons, 1967 |

ملخص

اعتمد الكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا لتسعة عشر سلالة تجميعية للأكتينومييسات ضد ستة بكتيريا ممرضة سالبة الغرام و ثلاثة بكتيريا ممرضة موجبة الغرام على استعمال تقنية الانتشار داخل أوساط الزرع الصلبة : تقنية اسطوانات الأجار .

أظهرت ثمانية عشر سلالة للأكتينومييسات قدرتها على تثبيط بكتيريا واحدة على الأقل و سلالة واحدة أكتينومييسيتال تفنقر إلى النشاط المضاد للبكتيريا

أختيرت السلالتان الأكتينومييسيتالية ذات الرمز 21 و 101 كأكثر سلالتين منتجتين للمضادات البكتيرية، و وسطا الزرع PELG و GELM كأحسن وسطين لإنتاج هذه الجزيئات الحيوية على التوالي.

سمحت لنا عملية الاستخلاص بمجموعة من المذيبات العضوية باختيار الكلوروفورم و الإيزوأميل أسيتات لاستخلاص الجزيئات المضادة للبكتيريا المنتجة من طرف السلالة 21، و الإيزوأميل أسيتات لاستخلاص تلك المنتجة من طرف السلالة 101.

أظهرت الدراسة الطيفية UV-Visible للسلالة 101 غياب قمم مميزة للمركبات الغير مشبعة في حين أظهرت الدراسة الطيفية UV-Visible للسلالة 21 إنتاج بالموازاة لمركبات مشبعة و أخرى غير مشبعة. المستخلصات الميثانولية للسلالة 21 الناتجة عن تركيز المستخلصات الخام الإيزوأميل أسيتاتية فعالة ضد *Pseudomonas aeruginosa* 13، في حين أظهرت المستخلصات الميثانولية الناتجة عن تركيز المستخلصات الخام الكلوروفورمية نشاطها ضد *Pseudomonas aeruginosa* 13 و *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. المستخلصات الميثانولية للسلالة 101 فعالة ضد البكتيريا الثلاث المختبرة .

كشفت التقنية الكروماتوغرافية المنجزة على طبقة رقيقة من GF₂₅₄ gel de silice عن وجود ثلاث أنواع من الجزيئات : غلوسيدية ، ليبيدية و إيثر في المستخلصات الميثانولية للسلالة 21، و جزيئات تشبه السالفة نكرها صف إليها جزيئات أخرى ذات طبيعة بروتينية في المستخلصات الميثانولية للسلالة 101.

الكلمات المفتاحية : اكتينومييسات، المضادات الحيوية، النشاط المضاد للبكتيريا، المستخلصات العضوية

Abstract

Antibacterial activities of 19 strains of actinomycetes were determined using agar cylinder technique against six Gram-positive test bacteria and three Gram-negative test bacteria.

Among 19 actinomycetes strains, 18 strains showed antibacterial activities against at least one of the test-bacteria and one strain don't have antibacterial activities. The actinomycètes strains 21 and 101 were screened as potential producers of antibacterial agents and GELM and PELG culture media as the best media of antibacterials production, respectively.

The extraction by various organic solvents permit to choice the chloroforme and isoamyle acetate for extracting antibacterial molecules produced by the actinomycetale strain 21, and isoamyle acetate for extracting antibacterial molecules produced by the strain 101. Statistical analysis prove that the production and the stability of antibacterial agents

Ultraviolet-Visible (UV –Visible) spectra of the strain 101 suggested the absence of peaks characteristic of polyenic compounds. However, those of the actinomycetal strain 21 showed the co-production of polyenique and non polyenique compounds.

The physico-chemical features of the extracted antibacterials and stability of the antibacterial activities were studied according to several parameters.

Methanolic extracts of the strain 21 result from the concentration of isoamylacetatic extracts were actif against *Pseudomonas aeruginosa* 13. However, those result from the concentration of chloroformic extracts showed antibacterial activity against *Pseudomonas aeruginosa* 13 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Methanolic extracts of the strain 101 were actif against both the three test-bacteria.

Thin layer hromatography on silicagel makes clear the presence of three types of molecules : glucidic, lipidic, ether in methanolic extracts of the strain 21. The same type of molecules plus other with proteinic nature were present in methanolic extracts of the strain 101.

Key words : Actinomycetes, antibiotics, antibacterial activities, organic solvents.

| | |
|---|---|
| Nom : LOUCIF Prénom : Karima | Date de soutenance 14 / 07 / 2011 |
| Diplôme de MAGISTERE en Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne | |
| <u>Intitulée :</u> Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire des molécules bioactives | |
| <p>Résumé</p> <p>L'activité antibactérienne des 19 souches de collection d'actinomycètes a été mise en évidence envers six bactéries à coloration de Gram négative, et trois bactéries à coloration de Gram positive. Elle a été réalisée par la technique des cylindres d'Agar. Sur les 19 souches actinomycétales testées, une souche n'a pas d'activité antibactérienne, et 18 souches ont montré une activité vis-à-vis au moins une bactérie-test. Les souches d'actinomycètes 21 et 101 sont sélectionnées comme les plus productrices d'antibactériens et les milieux de culture PELG et GELM comme les meilleurs milieux de production respectivement.</p> <p>L'extraction par une batterie de solvants organiques à polarité différente nous a permis de choisir le chloroforme et l'isoamyle acétate pour extraire les molécules antibactériennes produites par la souche 21 et l'isoamyle acétate pour extraire celles élaborées par la souche 101.</p> <p>Les spectres UV –Visible de la souche 101 ne montrent aucun pic caractéristique des polyènes tandis que ceux de la souche 21 montrent une co-production d'antibiotiques polyéniques et non polyéniques.</p> <p>Les extraits méthanoliques de la souche 21 issus de la concentration des extraits brutes isoamylacétatiques sont actifs envers <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13, tandis que ceux issus de la concentration des extraits chloroformiques ont montré une activité envers <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 13 et <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923. Les extraits méthanoliques de la souche 101 sont actifs contre les trois bactéries-tests.</p> <p>La technique chromatographique sur couche mince de gel de silice a révélé la présence de trois types de molécules : glucidiques, lipidiques, et éthers dans les extraits méthanoliques de la souche 21. Des molécules de la même nature que celles de la souche 21 additionnant des molécules portant des résidus amines sont présentes les extraits méthanoliques de la souche 101.</p> | |
| <p>Mots clés : Actinomycètes, antibiotiques, activité antibactérienne, solvants organiques</p> | |