

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique  
Université « Dr. Moulay Tahar » de Saïda

FACULTE DES SCIENCES  
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE



Mémoire préparé en vue de l'obtention du diplôme de

**Master**

**Spécialité : Biologie**

**Option : Biochimie et physiologie cellulaire**

Présenté par

*M<sup>elle</sup> : Naimi somia*

--- ○○○○ ○ ---

Sur le thème

**Contribution à la caractérisation biochimique des substances  
antibactériennes sécrétées par des actinomycètes isolées à partir  
des sols des zones arides de la région d'El Bayadh**

--- ○○○○ ○ ---

Soutenus publiquement devant le jury composé de :

Mr. Adli D. H.	M.A.A. Université de Saïda	Président
Mr. Benreguiég M.	M.C.B. Université de Saïda	Promoteur
Mr. Gacemi B.	M. A.A. Université de Saïda	Examineur

**Année universitaire 2014/ 2015**

## *Remerciements*

*Avant toute chose, je tiens à remercier « ALLAH » qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.*

*A mon encadreur Mr. Benreguiég M. Qu'il me soit ici permis de vous remercier très sincèrement pour avoir accepté la responsabilité de ce travail malgré vos nombreuses obligations. Je suis très honorée d'avoir pu bénéficier de vos remarques et de vos compétences tout au long de cette année.*

*Mes remerciements s'adressent, également, aux membres du jury*

*Mr Gacemi, et Mr. Adli pour l'intérêt qu'ils ont porté à notre étude en acceptant d'examiner notre travail et de l'enrichir par leurs propositions*

*Je remercie également toutes les personnes et particulièrement Mr. Kaid et mes enseignants, qui m'ont aidé durant cette année de ma formation.*

*Mes sincères remerciements vont aussi Mr. Adli.D.E, et Mr. Halla N.*

*Un grand merci à tous les membres du laboratoire de Saida-Faculté des sciences et technologies Mr. Benmhamed, Mr, Benhmida, Madame chaalane, Madame Belghali*

*Je remercie aussi tous mes amis pour leur aide, leur patience, leur compréhension et leur encouragement surtout, Kharfia, Iman, Abdel Kader,*

*En fin, je remercie toute ma promotion de biologie master II (Biochimie et physiologie cellulaire). Et tous qui ont contribué de près ou de loin dans la réalisation de ce travail.*



## *Dédicace*

*Avec l'aide de Dieu tout puissant, j'ai pu achever ce travail que je dédie :*

*A ma très chère maman, pour m'avoir toujours écouté, pour son soutien moral et ces précieux conseils.*

*A toi le plus cher, mon oncle dîne qui ma encouragé, qui ma donné la force, la volonté de surmonter tous les obstacles et les difficultés, aidé et guidé vers le chemin de la réussite*

*A tous mes cher oncles Djdidé, Mohammed, Abdel Kader, et leur épouses qui ont toujours été là pour moi et qui m'ont donné un encouragement magnifique et persévérant.*

*A mes très chère tantes Fatima, Kheira et son mari Arbi,*

*A mes très chers frères Mostapha, Zine AL Abidine, Abdel Hamid,*

*A mes très chères sœurs Malika, Nafisa*

*A mon très cher grand père El hadja dîne Boulghiete*

*A toute mes cousins et mes cousines*

*A toute ma famille paternelle et maternelle*

*A tous ceux qui mon chers*



## *Somia*

## Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. L'objectif de cette étude consiste en l'identification de la molécule bioactive élaborée par des actinomycètes.

Un total de 8 souches possédant un pouvoir inhibiteur contre au moins deux bactéries indicatrices est utilisé. Elles ont été isolées à partir des échantillons de différents sols arides de la wilaya d'Al Bayadh et identifiées physiologiquement et biochimiquement comme étant des *Streptomyces*.

L'activité antibactérienne a été testée vis-à-vis de 3 bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Bacillus subtilis* ATCC 10870), et 2 bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922). La technique des cylindres d'agar a été utilisée pour la recherche du pouvoir inhibiteur. Les 8 souches ont été cultivées ensuite par fermentation sur milieu solide AF afin de produire des extraits riches en métabolites secondaires. L'extraction a été faite par macération du milieu par le méthanol.

Les résultats obtenus montrent que les 8 souches d'actinomycètes sont actives contre au moins deux bactéries indicatrices. Aucune souche parmi les 8 n'a présenté une activité contre *P. aeruginosa*. L'extrait méthanolique était actif contre les 4 souches testées.

Les spectres UV-Visible des l'extraits méthanoliques des 8 souches montrent que ce sont des substances non polyniques.

La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) nous a orientés vers le choix du système solvant adéquat, il s'agit d'Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4). Il a donné une migration rapide des molécules bioactives avec une bonne séparation.

La bioautographie des 19 taches obtenue par la CCM montre que seulement 6 taches sont actives contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

L'analyse par CPG des composés actifs nous a permet de rapprocher de la famille chimique de la molécule bioactive. Les temps de rétention obtenus correspondent à un nombre de substances chimiques à pouvoir antibactérien tel que marinomycine, streptomycine et diethylphthalate.

**Les Mots clés :** Actinomycètes ; molécule bioactive ; sol aride ; activité antibactérienne, spectre UV visible, CCM, bioautographie, CPG.

## Abstract

The actinomycetes are bacteria responsible for producing most of bioactive molecules. The aim of this study is the identification of the bioactive molecule produced by actinomycetes.

A total of 8 strains with inhibitory effects against at least two indicator bacteria are used. They were isolated from samples of different arid soils of the province of Al Bayadh, physiologically and biochemically identified as *Streptomyces*.

The antibacterial activity was tested against of 3 Gram + bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, and *Bacillus subtilis* ATCC 10870) and two-gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922). The agar cylinder technique was used to research the inhibitory power. All the 8 strains were cultured on a solid medium by fermentation medium (AF) to produce secondary metabolites. The extraction was made by maceration by methanol.

The results obtained show that the 8 actinomycete strains are active against at least two indicator bacteria. No strain among 8 has shown activity against *P. aeruginosa*. The methanol extract was active against the four strains tested.

The UV-visible spectra of the methanol extracts of 8 strains show that they are not polynic substances.

The separation by thin layer chromatography (TLC) directed us to the choice of the suitable solvent system; it is methanol ethyl acetate (6: 4). He gave a rapid migration of bioactive molecules with good separation.

The 19 tasks bioautography obtained by TLC shows that only six tasks are active against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

GC analysis of active compounds allows us to approach the chemical family of the bioactive molecule. The retention times obtained corresponds to a number of chemical substances such as antibacterial marinomycine, streptomycin and diethylphthalate.

**Key words:** Actinomycets, Bioactive molecules, Soil arid, antibacterial activity, UV spectrum visible TLC, Bioautography, CG.

## ملخص

الاكتينومييسات هي بكتيريا مسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات البيولوجية النشطة حاليا. الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذه الجزيئات البيولوجية النشطة التي تفرزها الأكتينومييسات .

في عملنا هذا استعملنا ثماني سلالات أكتينومييسات وذلك لقدرتها التثبيطية ضد إثنين من البكتيريا الممرضة و المعزولة من عينات مختلفة من التربة الجافة لولاية البيض و المعرفة من الناحية الفسيولوجية و البيوكيميائية على أنها *Streptomyces*.

نشاط الاكتينومييسات المضاد للبكتيريا كان ضد ثلاثة بكتيريا ايجابية الغرام *Sataphylococcus aureus* ATCC 10870 , *Bacillus subtilis* ATCC 10870 , *Listeria monocytogènes* ATCC 15313, و 25923 وإثنين من البكتيريا سلبية الغرام (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922) هذا النشاط تم تحقيقه عن طريق تقنية أسطوانات الأجار , و أظهرت النتائج أن الاكتينومييسات الثمانية كانت نشطة ضد إثنين من البكتيريا الممرضة على الأقل بينما لم تظهر أي نشاط ضد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

وقد نمت هذه السلالات عن طريق التخمر في وسط انتقائي صلب AF و ذلك من أجل استخلاص المركبات الثانوية . بواسطة الميثانول و قد أظهرت هذه المركبات نشاط و فاعلية ضد أربع بكتيريا ممرضة (*Sataphylococcus aureus* , *Escherichia coli*, *Listeria monocytogènes* , *Bacillus subtilis* ) .

أظهرت نتائج امتصاص الضوء المرئي و فوق البنفسجي لهذه المستخلصات الخام الميثانولية أنها ذات طبيعة غير بولينية أما فصلها بواسطة CCM فإن نظام المذيبات (أسيتات الايثيل مع الميثانول ) كان الأحسن من بين 6 أنظمة مستعملة.

من بين 19 لطفة التي تحصلنا عليها عن طريق CCM, 6 لطخات فقط كانت نشطة ضد *S. aureus* و هذا النشاط تم تحقيقه بواسطة تقنية البيوأتوغرافيا

فصل هذه المستخلصات الخام الميثانولية عن طريق تقنية CPG أكد وجود جزيئات نشطة مضادة للبكتيريا في هذه المستخلصات أهمها : المارينوميسين الستراتوميسين و ثنائي الايثيل فتالات

**الكلمات المفتاحية :** الأكتينومييسات , الجزيئات البيولوجية النشطة , تربة جافة , نشاط مضاد للبكتيريا , CCM, البيوأتوغرافيا CPG .

## La liste d'abréviation

**Gram+**: Gram positive.

**Gram -** : Gram négative.

**pH** : Potentiel d'Hydrogène.

**ATB** : Antibiotique.

**Nacl** : Chlorure de sodium.

**ADN**: Acide désoxyribonucléique.

**ARN** : Acide ribonucléique

**ATCC**: American Type Culture Collection.

**°C** : Degré Celsius.

**%** : Pourcentage.

**S/cl** : Sous classe.

**S/O** : Sous ordre.

**ml** : Millilitre.

**µl** : Microlitre.

**g** : Gramme.

**h** : heure.

**S**: Seconde.

**nm** : Nanomètre.

**GN** : Gélose Nutritif.

**BN** : Bouillon Nutritif

**UFC** : unité formant colonie.

**V** : Volume.

**V/V**: Volume sur volume

**P/V**: Poids sur volume

**G**: Grossissement.

**µg** : Microgramme.

**G**: Grossissement.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Peroxyde d'hydrogène.

**O<sub>2</sub>**: Oxygène.

**G/C** : Guanine et cytosine.

**Min** : minute.

**GLM** : Glucose-Extrait de levure-Malt.

**ATP**: Adénine three phosphates

**PCB** : chlorobiphényles.

**AF:** Actinomycète fermentation

**MA:** Mycélium aérien,

**MS :** Mycélium de substrat

**S/C :** sous-classe

**S/O :** sous-ordre

**CCM :** Chromatographie sur couche mince

**CPG :** Chromatographie phase gazeuse

**Rf :** Rapport frontal

**Tr :** Temps de rétention

**SM :** Spectre de masse

**HPLC :** chromatographie liquide a haut pression

**RMN :** Résolution nucléaire magnétique

**PCR :** polymérase chain réaction

## La liste des figures

<b>Figure N°01</b> : Exemples de genres actinomycétales photographiés en microscopie électronique. Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997, ( <b>Joachin., 2002</b> ).....	6
<b>Figure N° 02</b> : Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i> ( <b>Horinouchi., 2002</b> ).....	11
<b>Figure N° 03</b> : 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 ( <b>Prescott et al., 2003</b> ) .....	12
<b>Figure N° 04</b> : Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) ( <b>Breton et al., 1989</b> ).....	15
<b>Figure N° 05</b> : Similarité de structure entre les antibiotiques à noyau $\beta$ -lactamimes (ici la pénicilline) ( <b>Calamita et Doyle, 2002</b> ).....	33
<b>Figure N° 06</b> : Structure d'un glycopeptide (la vancomycine) ( <b>Prescott et al., 2007</b> ).....	33
<b>Figure N° 07</b> : Structure de la fosfomycine ( <b>Oiwa, 1992</b> ).....	34
<b>Figure N° 08</b> : Principaux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane ( <b>Walsh et al., 2001</b> ).....	34
<b>Figure N° 09</b> : Structure des macrolides ( <b>Labro, 2002</b> ).....	35
<b>Figure N° 10</b> : Structure de la kanamycine (aminoglycoside) ( <b>Herman, 2005</b> ).....	36
<b>Figure N°11</b> : Structure des tétracyclines ( <b>Prescott et al., 2007</b> ).....	36
<b>Figure N°12</b> : Structure de Chloramphenicol ( <b>Prescott et al., 2007</b> ).....	37
<b>Figure N°13</b> : Principaux antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques ( <b>Walsh et al., 2001</b> ).....	37
<b>Figure N° 14</b> : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques ( <b>Walsh et al., 2001</b> ).....	38
<b>Figure N° 15</b> : Principaux antibiotique inhibiteurs des métabolismes intermédiaires ( <b>Azéle, 1979</b> ).....	39

<b>Figure N° 16 : Structure de la nystatine (Prescott <i>et al.</i>, 2007) .....</b>	<b>40</b>
<b>Figure N°17: <i>Staphylococcus aureus</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007) .....</b>	<b>48</b>
<b>Figure N° 18 : <i>Escherichia coli</i> vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).....</b>	<b>48</b>
<b>Figure N° 19: <i>Bacillus subtilis</i> vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007).....</b>	<b>48</b>
<b>Figure N°20 : <i>Listeria monocytogenes</i> vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007) .....</b>	<b>49</b>
<b>Figure N°21: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007).....</b>	<b>49</b>
<b>Figure N° 22 : Schéma du développement des fractions sur la plaque de CCM.....</b>	<b>58</b>
<b>Figure N°23 :Aspect du mycélium de substrat et du mycélium aérien sur les deux milieux des souches A14, A20, A18, A19, A16, A26.....</b>	<b>62</b>
<b>Figure N° 24 : Observation des souches d'actinomycètes (Gx 40).....</b>	<b>62</b>
<b>Figure N° 25 : Observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram.....</b>	<b>63</b>
<b>Figure N°26 : L'examen macroscopique de bactéries testées.....</b>	<b>64</b>
<b>Figure N° 27 : Coloration de Gram de bactéries testées (Gx100).....</b>	<b>65</b>
<b>Figure N° 28 : résultat du test catalase de <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>65</b>
<b>Figure N° 29. Résultat du test d'antibiogramme de bactéries indicatrices.....</b>	<b>67</b>
<b>Figure N° 30 : Inhibition de <i>Bacillus subtilis</i> par nos isolats d'actinomycètes.....</b>	<b>69</b>
<b>Figure N°31 : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre <i>S. aureus</i>.....</b>	<b>70</b>
<b>Figure N°32 : Résultat de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes contre <i>L. monocytogenes</i>.....</b>	<b>70</b>

<b>Figure N°33</b> : Résultat de l'activité antibactérienne de souches d'actinomycètes contre <i>E. coli</i> .....	71
<b>Figure N°34</b> Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre <i>E. coli</i> par la méthode des cylindres d'agar.....	71
<b>Figure N°35</b> Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre <i>L. monocytogenes</i> par la méthode des cylindres d'agar.....	72
<b>Figure N° 36</b> : Cultures d'Actinomycètes sur milieu AF solide.....	74
<b>Figure N° 37</b> . Les 8 extraits des 8 souches d'actinomycètes.....	75
<b>Figure N°38</b> .Les zones d'inhibition provoquées par l'extrait méthanolique des souches contre <i>E.coli</i> , <i>L. monocytogenes</i> , <i>S. aureus</i> .....	77
<b>Figure N° 39</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A6</b> .....	78
<b>Figure N° 40</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A14</b> .....	78
<b>Figure N° 41</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A16</b> .....	79
<b>Figure N° 42</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A18</b> .....	79
<b>Figure N° 43</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A19</b> .....	80
<b>Figure N° 44</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A20</b> .....	80
<b>Figure N° 45</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A26</b> .....	81
<b>Figure N° 46</b> : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche <b>A32</b> .....	81
<b>Figure N°47</b> . Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits brute méthanolique sous UV à 254( <b>D</b> ) et 365( <b>A, B, C</b> ) nm.....	84
<b>Figure N°48</b> : Bioautographie de la plaque CCM des extraits des souches A14, A16, A26 contre <i>S.aureus</i> .....	85
<b>Figure N°49</b> : Les graphes (1), (2), représentent les résultats de l'analyse par CPG des taches de l'extrait méthanolique de la souche A14.....	86

<b>Figure N°50 :</b> Le graphe (3) représente le résultat de l'analyse par CPG de taches actif de l'extrait méthanolique de la souche A16.....	87
<b>Figure N°51 :</b> Les graphes (4) représentent le résultat de l'analyse par CPG de taches actif de l'extrait méthanolique de la souche A18.....	87
<b>Figure N°52 :</b> Le graphe (5) représenté le résultat de l'analyse par CPG de tache de l'extrait méthanolique de la souche A19.....	88
<b>Figure N°53 :</b> Le graphe (6), représente le résultat de l'analyse par CPG de tache de l'extrait méthanolique de la souche A26.....	88

## La liste des tableaux

<b>Tableau N°1</b> : Répartition des actinomycètes dans la nature ( <b>Goodfellow et Williams, 1983</b> ).....	7
<b>Tableau N°2</b> : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents ( <b>Lechevalier et Lechevalier, 1967</b> ).....	8
<b>Tableau N°3</b> : La classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S ( <b>Garrity et al. 2004</b> ).....	19
<b>Tableau N°4</b> : Métabolites secondaire produit par les actinomycètes selon les groupes chimiques (1990-1994) ( <b>Sanglier et Trujillo, 1997</b> ).....	24
<b>Tableau N°5</b> : Bioactivités des métabolites isolés à partir d'actinomycètes (1990-1994) ( <b>Sanglier et Trujillo, 1997</b> ) .....	25
<b>Tableau N°6</b> : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.....	26
<b>Tableau N°7</b> :Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes.....	27
<b>Tableau N°8</b> : Exemple d'antibiotiques produits par des actinomycètes ( <b>Levreau et Bouix, 1993</b> ).....	29
<b>Tableau N°9</b> : Classification des antibiotiques ( <b>Zeghilet, 2009</b> ).....	31
<b>Tableau N°10</b> : Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels ( <b>Kirk et al., 2005</b> ).....	46
<b>Tableau N°11</b> : Caractéristiques des souches testées.....	47
<b>Tableau N°12</b> : Représente la Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince.....	58
<b>Tableau N°13</b> : Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives retenues.....	60
<b>Tableau N°14</b> : Résultats du test catalase des souches bactériennes testés.....	65
<b>Tableau N°15</b> : Résultat du test de l'antibiogramme des bactéries inductrices.....	66

<b>Tableau N°16</b> : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar.....	68
<b>Tableau N°17</b> : Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives dans le milieu AF.....	73
<b>Tableau N°18</b> : Les poids des extraits des 8 souches d'actinomycètes.....	75
<b>Tableau N°19</b> : Diamètre d'inhibition (mm) des extraits sur les souches testées.....	76
<b>Tableau N°20</b> :Résultat de la CCM des 8 extraits méthanoliques des souches d'actinomycètes .....	82
<b>Tableau N°21</b> : Diamètres et <i>Rf</i> des zones d'inhibition des fractions sur <i>S. aureus</i> .....	85

# Sommaire

Remerciement	
Dédicace	
Résumé	
Abstract	
ملخص	
Liste des abréviations	
Liste des figures	
Liste des tableaux	
Introduction.....	1

## Synthèse bibliographique

### Les actinomycètes

I. Les actinomycètes.....	3
I.1. Historique .....	3
I.2. Généralités .....	4
I.3. Morphologie.....	6
I.4. Ecologie et distribution dans la nature.....	7
I.4.1. Sols.....	8
I.4.2. Air.....	9
I.4.3. Eaux douces.....	9
I.4.4. Milieux marins.....	9
I.4.5. Les composts .....	9
I.4.6. Les végétaux, l'animaux, et l'homme .....	10
I.5. Biologie de développement .....	10
I.5.1. La germination des spores .....	11
I.5.2. Le mycélium du substrat.....	12
I.5.3. Le mycélium aérien.....	12
I.5.4. La formation des spores .....	13
I.5.4.1. Les exospores.....	13
I.5.4.2. Les endospores.....	14
I.5.5. Les facteurs qui contrôlant la sporulation.....	16
I.5.6. Thermorésistante des spores.....	16
I.5.7. Structures particulière.....	16
I.6. Génétique et structure d'ADN .....	17

I.7. Classification des actinomycètes .....	17
I.7.1. La classe " <i>Actinobacteria</i> " .....	18
I.7.2. Les genres et espèces de l'ordre <i>Actinomycetales</i> .....	20
I.7.2.1. Caractères morphologiques.....	20
I.7.2.2. Caractères chimiotaxonomiques.....	20
I.7.2.2.1. Les Acides aminés de la paroi.....	20
I.7.2.2.2. Les glucides.....	20
I.7.2.2.3. Les Acides gras.....	20
I.7.2.2.4. Les acides nucléiques .....	21
I.8. Les actinomycètes aérobie pathogène .....	21
I.8.1. L'actinomycétome .....	21
I.8.1.1. Généralités .....	21
I.8.1.2. Le traitement .....	22
I.8.2. La nocardiose .....	22
I.8.2.1. Généralités .....	22
I.8.2.2. Le traitement.....	22

## **II. Métabolisme d'actinomycète**

II. Métabolisme d'actinomycète.....	23
II.1. Métabolisme primaire .....	23
II.2. Métabolisme secondaire .....	24
II.3. Les substances bioactives produites par les actinomycètes.....	25
II.3.1. La production d'antibiotique chez les Actinomycètes.....	28
II.3.1.1. La classification des antibiotiques .....	29
II.3.1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques .....	32
II.3.1.2.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne .....	32
II.3.1.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	35
II.3.1.2.3. Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques.....	38
II.3.1.2.4. Action sur le métabolisme intermédiaire .....	39
II.3.1.2.5. Action sur la membrane cytoplasmique.....	39
II.3.1.2.6. Antibiotiques antifongiques.....	40
II.3.1.3. La résistance aux antibiotiques.....	40
II.3.1.3.1. La résistance naturelle .....	40
II.3.1.3.2. La résistance acquise .....	41

II.3.1.3.2.1. Mutation chromosomique spontanée .....	41
II.3.1.3.2.2. Acquisition de gènes de résistance par un autre organisme .....	41
II.3.1.4.Mécanismes de régulation de la production d'antibiotiques chez les actinomycètes.....	41
II.3.1.4.1.Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes.....	42
II.3.1.4.2.Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques.....	42
II.3.1.4.3.Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques.....	42
II.3.1.4.4.Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques.....	42
II.3.1.4.5.Effet du pH, de la température et du temps d'incubation.....	43
II.3.1.5. Application des antibiotiques issus des Actinomycètes.....	43
II.3.1.5.1.En santé humaine.....	43
II.3.1.5.2.En santé animale et élevage.....	44
II.3.1.5.3.En agriculture.....	44
II.3.2. Les actinomycètes producteurs d'enzymes de biodégradation .....	44
II.3.2.1.Enzymes de biodégradation des composés organiques naturels.....	45
II.3.2.2.Enzymes de biodégradation des composés organiques de synthèse.....	45
II.4.Caractérisation des microorganismes testent .....	47

## **Partie expérimentale**

### **Matériels et méthodes**

III.1. Objectif ... ..	50
III.2. Revivification des souches d'actinomycètes.....	51
III.2.1.Vérification de la pureté des souches .....	51
III.2.1.1.Macromorphologie et caractères cultureux .....	51
III.2.1.2.Micromorphologie.....	51
a).Observation au faible grossissement .....	51
b).Observation au fort grossissement.....	52
III.3.Conservation des souches d'actinomycètes.....	52
III.4.Confirmation de l'identité et de la pureté des souches indicatrices.....	53
III.4.1.Observation macroscopique.....	53
III.4.2.Observation microscopique .....	53
III.4.3.Test biochimique.....	53
III.4.4. Test d'antibiogramme.....	53
III.5. Recherche de l'activité antibactérienne .....	54
III.5.1.Revivification des bactéries testes.....	54

III.5.1.1.Préparation des inocula des bactéries-tests.....	54
III.5.2.Méthodes des cylindres d'agar.....	54
III.6.Production et extraction de métabolites secondaires.....	55
III.6.1.Extraction à partir du milieu solide.....	55
III.6.2.Technique des disques.....	55
III.7.Caractérisation de la molécule bioactive.....	55
III.7.1.Etude du spectre UV-Visible .....	55
III.7.2.Chromatographie sur couche mince (CCM).....	56
III.7.3.Bioautographie des molécules bioactives.....	59
III.7.4.Chromatographie phase gazeuse (CPG).....	59

## **Résultat et interprétation**

IV.1. Résultats de la revivification des souches d'actinomycètes représentatives.....	60
IV.2. Etude morphologique .....	60
IV.2.1. Macromorphologie et caractères cultureux .....	60
IV.2.2. Micromorphologie.....	62
IV.2.2.1.Observation au faible grossissement.....	62
IV.2.2.2. Résultat de la coloration de Gram.....	63
IV.3. Résultat de confirmation de l'identité et de la pureté des souches indicatrices.....	63
IV.3.1. L'aspect macroscopique.....	63
IV. 3.2.Coloration de Gram.....	64
IV.3.3. Résultats du test de catalase.....	65
IV.3.4.Résultat de l'antibiogramme.....	66
IV.4. Résultat de l'activité antibactérienne .....	68
IV.4.1.Méthode des cylindres d'agar .....	68
IV.4.1.1.Test d'activité antibactérienne.....	68
IV.5.Résultat de la production et extraction de métabolites secondaires.....	72
IV.5.1.Résultat de la fermentation sur milieu solide.....	72
IV.5.2.Résultat d'extraction à partir du milieu solide .....	75
IV.5.3.Activité antibactérienne des extraits méthanoliques .....	76
IV.6.Caractérisation de l'extrait méthanolique actif.....	77
IV.6.1.Résultats du spectre UV-Visible .....	77
IV.6.2.Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM).....	82
IV.6.3. Résultats de la bioautographie.....	84

IV.6.4.Résultats de la chromatographie phase gazeuse (CPG) .....	86
Discussion .....	89
Conclusion et perspective.....	98
Référence bibliographique .....	100
Annexe.....	117

# *Introduction*

Le sol, a été rapporté comme source potentielles de produits naturels très utiles comme les antibiotiques (**Rakotoniriana, 2006**). Depuis l'avènement de ces molécules, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée (**Boughachiche et al., 2005**).

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 jugulées, 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 cette résistance est en augmentation inquiétante car et depuis l'apparition des premiers agents anti-infectieux tels que les pénicillines et les sulfamides, les bactéries s'adaptent à l'environnement imposé par l'utilisation massive de ces substances. Au problème de la résistance bactérienne, il faut ajouter l'incidence des infections nosocomiales (**Decre et Courvatlin, 1995**), 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**).

Ces résistances aux antibiotiques aux doses thérapeutiques apparaissent plus ou moins rapidement selon la complexité chimique des antibiotiques et du patrimoine génétique de la bactérie. Actuellement quel que soit l'antibiotique utilisé, il existe des souches de différentes espèces bactériennes qui leur sont résistantes. Le mécanisme de résistance peut avoir comme support génétique un gène d'origine plasmidique ou chromosomique. La réponse de la bactérie est souvent complexe que, il peut s'agir d'empêcher l'antibiotique de pénétrer à l'intérieur de la cellule bactérienne, d'inactiver le xénobiotique par des enzymes ou modifier le site d'action de l'antibiotique. Toutes les espèces ou genres bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibactériens posant parfois de véritables problèmes thérapeutiques (**Kitouni, 2007**).

Alors l'obtention de nouveaux antibiotiques (antibactériens et antifongiques) est devenue donc une nécessité. Devant cette émergence de l'antibiorésistance, 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.

\* La réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure connue ou la synthèse de nouveaux dérivés.

\* L'analyse des produits de fermentation de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques isolées d'écosystèmes peu ou pas explorés (**Berdy, 1974**).

Pour ces trois approches, les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production d'antibiotiques notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces* et en constituent le réservoir le plus important dont plus de la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement sont produits par ces bactéries filamenteuses. Ces antibiotiques de structures chimiques très diverses exercent des activités variées qui peuvent être de type antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiparasitaire ou antiviral (**Theilleux, 1993**).

Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices. L'exploration des écosystèmes où un ou plus des facteurs environnementaux sont extrêmes (température, pH, aération ou stress osmotique) favorise la détection d'Actinomycetales pouvant, éventuellement, avoir un potentiel d'activité antibactérien et/ou antifongique importante (**Williams et Cross, 1971**).

Cette étude a pour objectif d'identifier les molécules bioactives contenus dans les métabolites secondaires secrétés par des actinomycètes isolées à partir du sol des zones arides. Les caractérisations de ces substances se fait après le choix des meilleurs solvants d'extraction et de séparation et en se basant sur des techniques spectrales et chromatographiques adéquates.

*Synthèse*

*Bibliographique*

# *Les actinomycètes*

## I. Les actinomycètes :

### I.1. Historique :

Les Actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaines (**Williams et al., 1984**) , en 1877 Bollinger , a rapporté les granules jaunes dans les masses de mâchoire de bétail ( **David J. M. Haldane, 2007** ) . L'agent étiologique des actinomycoses, précédemment décrit par Harz sous forme de grains parasites, a été isolé par Israel en 1879 qui décrit l'aspect clinique de la maladie .Il s'agit d'un bacille anaérobie pour lequel Wright propose le binôme *Actinomyces bovis* et *kruse*, en **1896** celui d'*Actinomyces israelii* .

La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de Kraisky, de Cohn, de Waksman et de Curtis. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, de Lieske, de Krassilnikov entre autre.

La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Selman Waksman lui est indissolublement lié (**Le minor, 1989**). Les actinomycètes ont été à l'origine de la découverte de l'actinomycine par Waksman en 1940 à partir d'une culture de *Streptomyces antibioticus* (**Waksman et Woodruff, 1940**), et de la streptomycine chez *Streptomyces griseus* (**Shartz et al. 1944**).

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**), leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques 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**).

Les bactériologistes considèrent les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons, (**Gottlieb, 1973**).

Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (**Becker et al ., 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981**) . Ils sont abondamment distribués dans la nature. Les actinomycètes sont importants en raison surtout de

leur rôle dans la fertilisation des sols, synthèse de composés complexes comme les antibiotiques, les vitamines, les stérols...etc (**Larpen et Sanglier, 1989**).

## I.2. Généralités :

Les actinomycètes sont des procaryotes à structure de bactéries à Gram positif (**Williams et al ., 1973 ; Sanglier et Trujillo, 1997**) , situent dans l'ordre des actinomycétales (**Mariat et Sebald, 1990**), ce sont des bactéries filamenteuses , septées , ramifiées, la plupart sont immobiles (**Larpen et Sanglie, 1989**) , lorsqu'il y a mobilité, elle est limitée ( **Prescott et al.,1995**).

La plupart des Actinomycètes aérobies sont saprophytes à développement mycélien significatif parmi lesquels se trouve la majorité des espèces d'intérêt industriel bien qu'il en existe des formes anaérobies ou sans mycélium évident, généralement pathogènes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des animaux ou des plantes (**Goodfellow et Williams, 1983**). Le genre *Frankia* s'intègre aux racines, fixe l'azote et joue un rôle dans la protection des plantes contre les pathogènes (**Thirupl et al ., 2001**).

Elles ont un coefficient de chargaff (G+C%) est supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75 % (**Ensign, 1978 ; Larpen et Sanglier, 1989 ; Chun et al ., 1997**).

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (**Eunice et Prosser, 1983**). Constituées d'hyphes (**Figure N°1**), c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et prosser, 1983**). Cela explique leur dénomination, le mot Actinomycète provient de deux substantifs grecs « Actino » et « Mycète » et signifie «champignons à rayon» ou «champignons rayonnants» (**Lechevalier, 1988 ; Zimmerman, 1990**), le diamètre des hyphes est plus petit que celui des champignons (**Gottlieb, 1973**).

Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0,5-1,0 µm de diamètre) (**Eunice et Prosser, 1983**). Leur croissance, avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries ; (**Ottow et Glathe, 1968 ; Larpen et Sanglier, 1989**), ils croissent en l'espace de quelques jours à quelques semaines (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques...etc, les rangent parmi les procaryotes (**Williams et al ., 1973**) . 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 identique à celle des bactéries (**Larpent et Sanglier, 1989**).

Les actinomycètes n'ont pas de membrane nucléaire, elles possèdent des organites flagellaires ressemblant à ceux des bactéries. Elles sont, pour la plupart, sensibles au lysozyme et aux agents antibactériens (**Gottlieb, 1973**). Ces caractères s'ajoutant à d'autres (existence d'espèces anaérobies strictes, sensibilité à des actinophages ...) confirment leur classification parmi les bactéries (**Demain et Solomon, 1985; Mariat et Sebald, 1990**).

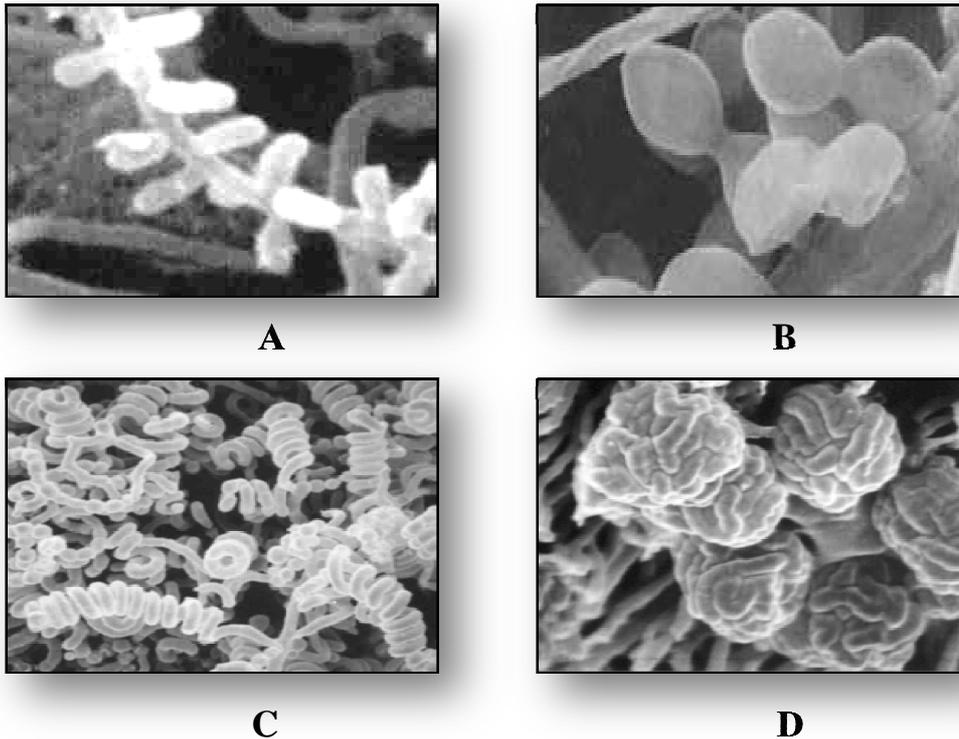
Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolèrent des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (**Omura, 1992**).

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc. (**Perry et al., 2004**).

En général, les actinomycètes sont hétérotrophes ou chimiotrophes mais la plupart sont des chimio-hétérotrophes capables d'utiliser une grande variété de sources d'énergie y compris les polymères complexes (**Lechevalier, 1988 ; Zimmerman, 1990**).

Certaines ont des exigences nutritionnelles tels que les vitamines et certains acides aminés. Ils colonisent fréquemment les substrats insolubles tel que le charbon par pénétration mécanique de la matrice (**Crawford et al., 1993**), et peuvent dégrader les protéines, la cellulose et d'autres matières organiques comme la paraffine (**Hernandez-Coronado et al., 1997**) et les résidus des plantes dans le sol (**Lacey, 1997**).

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



**Figure N°1 :** Exemples de genres actinomycétales photographiés en microscopie électronique.

Photos dans l'Atlas des actinomycètes 1997, (Joachin, 2002).

**A :** *Saccharomonospora viridis*.

**B :** *Actinobispora*

**C :** *Streptomyces*.

**D :** *Actinoplanes*.

### I.3. La morphologie :

Morphologiquement, les actinomycètes peuvent être classés en deux groupes. Le premier : se compose d'organismes qui ne présentent pas de caractéristiques morphologiques particulières et forment seulement une masse de filaments ramifiés (mycélium). Le second : comprend les organismes qui sont morphologiquement plus complexes que le premier (Lechevalier et Lechevalier, 1985).

La morphologie des différents groupes d'Actinomycètes est très variable. Elle va de simples bacilles diphtéroïdes à des formes mycéliennes complexes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et dans les milieux (mycélium végétatif ou mycélium de substrat) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermées dans un sporange ou conidies qui libèrent des spores de formes variées, d'aspects lisses, ridée, etc, soit isolées soit groupées en chaînes, etc. Certains actinomycètes forment un mycélium non persistant

rapidement transformé en une masse de formes bactéroïdes irrégulières. D'autres enfin, ne présentent que des mycéliums très rudimentaires.

L'analyse par image des actinomycètes révèle la présence de deux catégories d'hyphes : Les hyphes dispersés et les hyphes en pellets. Dans les hyphes dispersés, la forme "Freely dispersed" et les "mycelial clumps" sont rencontrées. La première forme c'est des hyphes indépendants dispersés, la seconde est une masse ou agrégats de mycélium. Les actinomycètes donnant des hyphes en pellets, posent en fermentation des problèmes de limitation de diffusion de l'oxygène et des nutriments à travers l'hyphe. Ceci engendre une diminution de la croissance et peut conduire à une autolyse. Ce point doit être pris en considération, pour éviter ce genre de problème lors des fermentations industrielles. Heureusement, pour plusieurs souches productrices de métabolites secondaire, la forme "Clups" ou masse est la prédominante dans les fermenteurs (90% des cas) (Perry *et al.*, 2004).

#### I.4. Ecologie et distribution dans la nature :

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques, sont très largement distribués dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures (Tableau N°1). Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers.

Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (Lacey, 1973 ; Porter, 1971 ; Waksman, 1959 ; Williams *et al.*, 1984) .

**Tableau N°1 : Répartition des actinomycètes dans la nature (Goodfellow et Williams, 1983).**

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

**I.4.1. Sols :**

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions trop extrêmes. Ils sont surtout présents dans la couche comprise entre la surface du sol et jusqu'à 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur d'humus des sols (**Omura, 1992 ; Zaitlin et al ., 2003**) , Waksman a pu démontrer que le nombre des actinomycètes diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente ( **Waksman , 1963** ) . Selon cet auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total de microorganisme.

Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des souches d'actinomycètes isolées (**Tableau N°2**). Les facteurs importants contrôlant l'abondance et l'activité des actinomycètes dans le sol sont : la disponibilité des nutriments, la nature et l'abondance de la matière organique, la salinité, la teneur en humidité relative, la température, le pH et la végétation du sol (**Goodfellow et Williams, 1983**).

La croissance du mycélium végétatif des actinomycètes dans le sol est favorisée par un faible taux d'humidité, particulièrement quand les spores sont remplies d'eau. Dans les sols secs où la tension d'humidité est plus grande, la croissance devient très limitée voir même arrêtée (**Goodfellow et Williams, 1983**).

**Tableau N°2:** Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**).

Genres	%
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,40
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

**I.4.2. Air :**

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport. Les spores des actinomycètes sont des contaminants importants de notre environnement. L'exposition à ces derniers peut causer des effets néfastes sur la santé (**Gazenko et al ., 1998 ; Reponen et al., 1998 ; Suutari et al ., 2002**).

**I.4.3. Eaux douces :**

Les actinomycètes isolés dans les eaux douces appartiennent et plus souvent aux genres *Micromonospora* , *Streptosporangium*, *Nocardia* et *Streptomyces* .

Les actinomycètes intéressent les hydrobiologistes qui les suspectent d'être les agents responsables des goûts et des odeurs terreuses qui apparaissent parfois dans les eaux de consommation. De nombreux composés volatiles complexes ont été isolés et caractérisés .Les plus fréquemment cités sont la géosmine. La mucidone et la 2-méthyl-isobornéol. Ce dernier composé peut donner à l'eau des odeurs, même à basse concentration (0.22ppm) (**Cross, 1981**) .Mais le fait que ces composés soient produits directement dans l'eau par les actinomycètes est discutable .En effet, à partir des travaux effectués dans les réservoirs naturels d'eau, **Cross** a émis l'hypothèse que ces composés seraient produits dans les réservoirs par les infiltrations et les eaux de ruissellement (**Cross, 1981**).

**I.4.4. Milieux marins :**

Les actinomycètes ont été également mentionnés dans les milieux marins (**Woo et al ., 2002**). L'écologie des actinomycètes des mers et du littoral a été revue par (**Goodfellow et Williams, 1983**). il a été démontré que les actinomycètes constituent une petite partie de la flore totale ; leur nombre est faible comparé à leur présence dans les eaux douces ou les sols .Quelques chercheurs considèrent les actinomycètes marins comme une partie de la microflore indigène marine alors que d'autre les considèrent comme des survivants du lavage marin des sédiments et du littoral (**Moore et al ., 1999**). Cette théorie est basée sur le fait que le nombre d'actinomycètes rencontrées dans l'eau de mer diminue avec la distance qui sépare le lieu de prélèvement de la cote (**Okami et Okazaki, 1978; Xu, 1996**).

**I.4.5. Les composts:**

Le compostage est défini comme étant la décomposition biologique thermophile, en présence d'oxygène et dans des conditions contrôlées, de déchets organiques collectés séparément, sous l'action de micro et micro-organismes, afin de produire du compost. Le

compost, produit final du compostage est composé pour l'essentiel de la matière organique de type humique stable et de composés minéraux (Mustin, 1987).

Les actinomycètes sont isolés des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tel que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia* sont actifs dans les derniers stades du compostage. Ils se sont spécialisés dans l'attaque des structures plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine. (Ensign *et al.*, 1993 ; Lacey, 1997 ; Song *et al.*., 2001)

#### I.4.6. Les végétaux, l'animal, et l'homme :

Dans la distribution naturelle des actinomycètes, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'homme pour lesquels certains sont pathogènes. Parmi les exemples les mieux connus, il faut citer :

- *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de pomme de terre.
- *Actinomyces bovis*, responsable d'une actinomycose chez le bétail.
- *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium leprae*, agents des maladies correspondantes.
- *Nocardia asteroides*, responsable de la nocardiose humaine.
- *Micropolyspora faeni*, responsable d'une pneumonie allergique chez l'homme (Ensign *et al.*., 1993; Song *et al.*., 2001).

#### I.5. Biologie de développement:

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes. Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes.

Ainsi, les actinomycètes les plus différenciées développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distincts : le mycélium aérien et le mycélium du substrat. Selon les cas, des spores peuvent se former sur le mycélium aérien ou sur le mycélium du substrat ou les deux à la fois, elles permettent la propagation de la souche. (Zermane, 2008).

Par exemple, 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 uni nucléées comme le montre la figure N°2 (Flårdh et Bruttner, 2009).

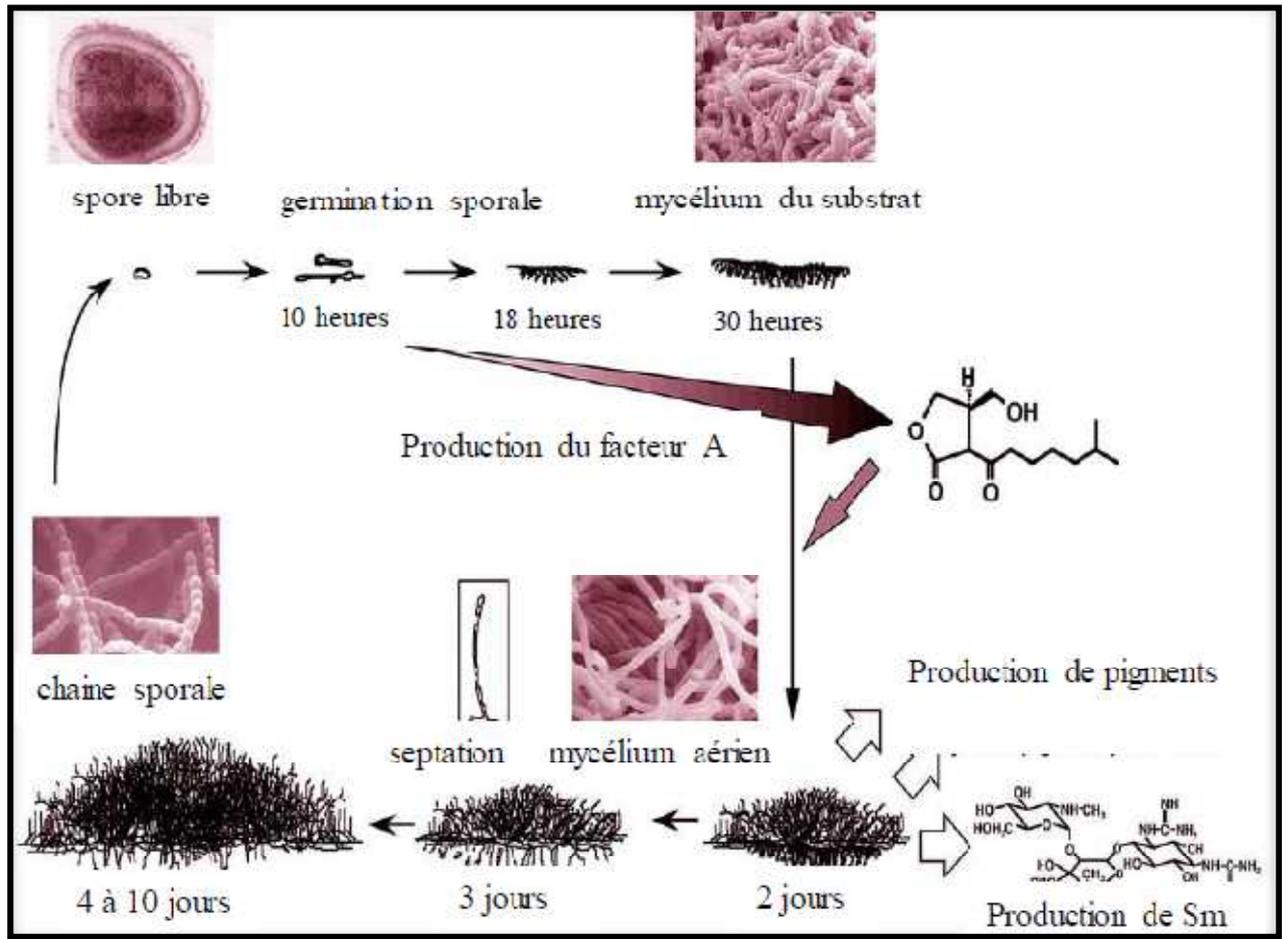


Figure N° 2 : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002).

### I.5.1. La germination des spores :

Les spores germent pour donner naissance à un mycélium. On distingue généralement quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube de germination et la croissance de celui-ci.

Les exospores dont la dormance est de type exogène, sensible au milieu, germent après activation par un choc thermique qui peut être par exemple de 50 °C chez *S. viridochromogenes*, suivie d'une initiation en présence de L-alanine, d'adénosine, d'acide glutamique, d'acide para-aminobenzoïque, d'ions Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup> et de CO<sub>2</sub>. L'oxydation des réserves de tréhalose fournit l'énergie nécessaire.

Les endospores de *Thermoactinomyces* ne germent dans des conditions de milieu favorable qu'avec une activation spécifique de nature physique. Un refroidissement à 20 °C de 2 à 48 h est nécessaire pour permettre aux spores de *Thermoactinomyces vulgaris* de répondre ensuite au choc thermique de 55 °C inducteur de la germination (Leveau et Buix, 1993).

### I.5.2.. Le mycélium du substrat :

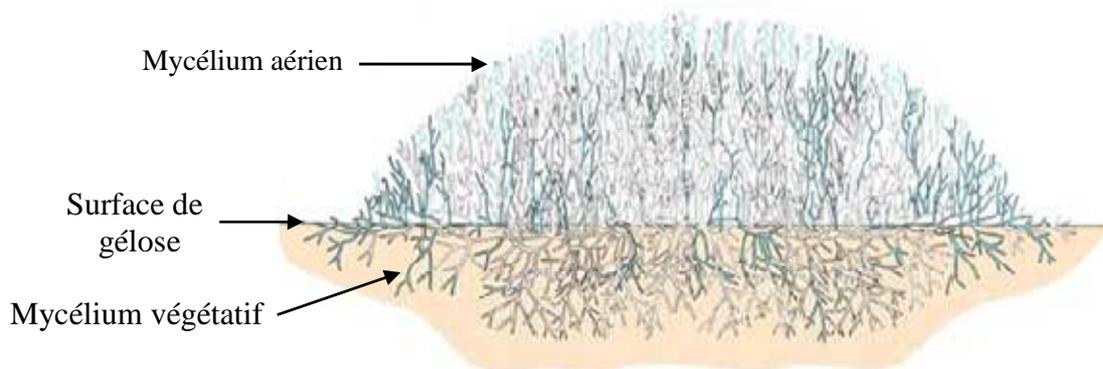
Le mycélium du substrat est aérobic facultatif (**Silvey et Roach, 1975**), également, dénommé mycélium végétatif ou primaire (**Figure N°3**), se développe à partir du tube de germination issu de la spore (**Theilleux, 1993**). La croissance des hyphes est apicale et l'ensemble de la colonie se développe radialement. Le mycélium éventuellement pigmenté, forme des parois transversales isolant les zones les plus âgées (**loci, 1976**). La largeur des filaments mycéliens varie de 0.5 à 2µm. Leur ramification est très souvent monopodiale mais parfois dichotomique ou verticillée. (**Chater et Merrick, 1979**).

Le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments .Cette habitude de formation de mycélium de substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leur enzymes extracellulaire (**loci, 1976**).

### I.5.3. Le mycélium aérien:

Le mycélium aérien, est aérobic strict (**Silvey et Roach, 1975**), appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat (**Figure N° 3**).

Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat, ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe (**Prescott et al ., 2003**). Une fois développé, le mycélium aérien couvre les colonies de surface en leur donnant un aspect poudreux, compact, poilu ou en chou-fleur. La production de mycélium aérien est influencée par plusieurs facteur, notamment: la composition du milieu de croissance, la température d'incubation et la présence de composés stimulant spécifiquement le mycélium aérien (**Pine, 1970**).



**Figure N° 3** : 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**).

#### I.5.4. La formation des spores :

Les spores d'actinomycètes ont une fonction de dispersion et de survie dans des conditions défavorables de croissance végétative. Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores (**Figure N°4**).

La viabilité des spores est fonction de leur type : des endospores de *Thermoactinomyces* ont survécu plusieurs centaines d'années dans des sédiments lacustres à 5 °C. Comparativement, des exospores sèches de *Streptomyces* survivent 20 à 30 ans comme les conidies de champignons. (**Leveau et Buix, 1993**).

##### I.5.4.1. Exospores :

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**).

Elles naissent de la formation de paroi transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphes sporogène.

Ainsi, la formation d'exospores par fragmentation d'hyphes du substrat sans enveloppe se rencontre avec *Micromonospora*.

Les conidies peuvent, suivant les groupes, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), et/ ou en longues chainettes (*Streptomyces*). Les chainettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*). Ces exospores contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire:

- Un seul nucléotide correspondant à un seul génome haploïde pour les spores de *streptomyces*
- Le contenu du génome des exospores est plus riche en ADN mais moins en ARN que celui du mycélium du substrat.
- Un système membranaire intracytoplasmique .
- Des ribosomes dissociables en sous- unités 30s et 50s.
- Des vacuoles.
- Une membrane cytoplasmique.

- Une paroi plus épaisse qui peut contenir jusqu'à trois couches auxquelles peuvent s'ajouter des éléments externes.

Ces exospores ne contiennent pas d'acide dipicolinique mais des quantités plus importantes de potassium, calcium et manganèse que dans le mycélium du substrat. Elles englobent aussi souvent des pigments. Leur contenu en tréhalose, relativement abandon, aurait un rôle dans la dormance et la résistance des spores (**Mc Bride et Ensign, 1987**).

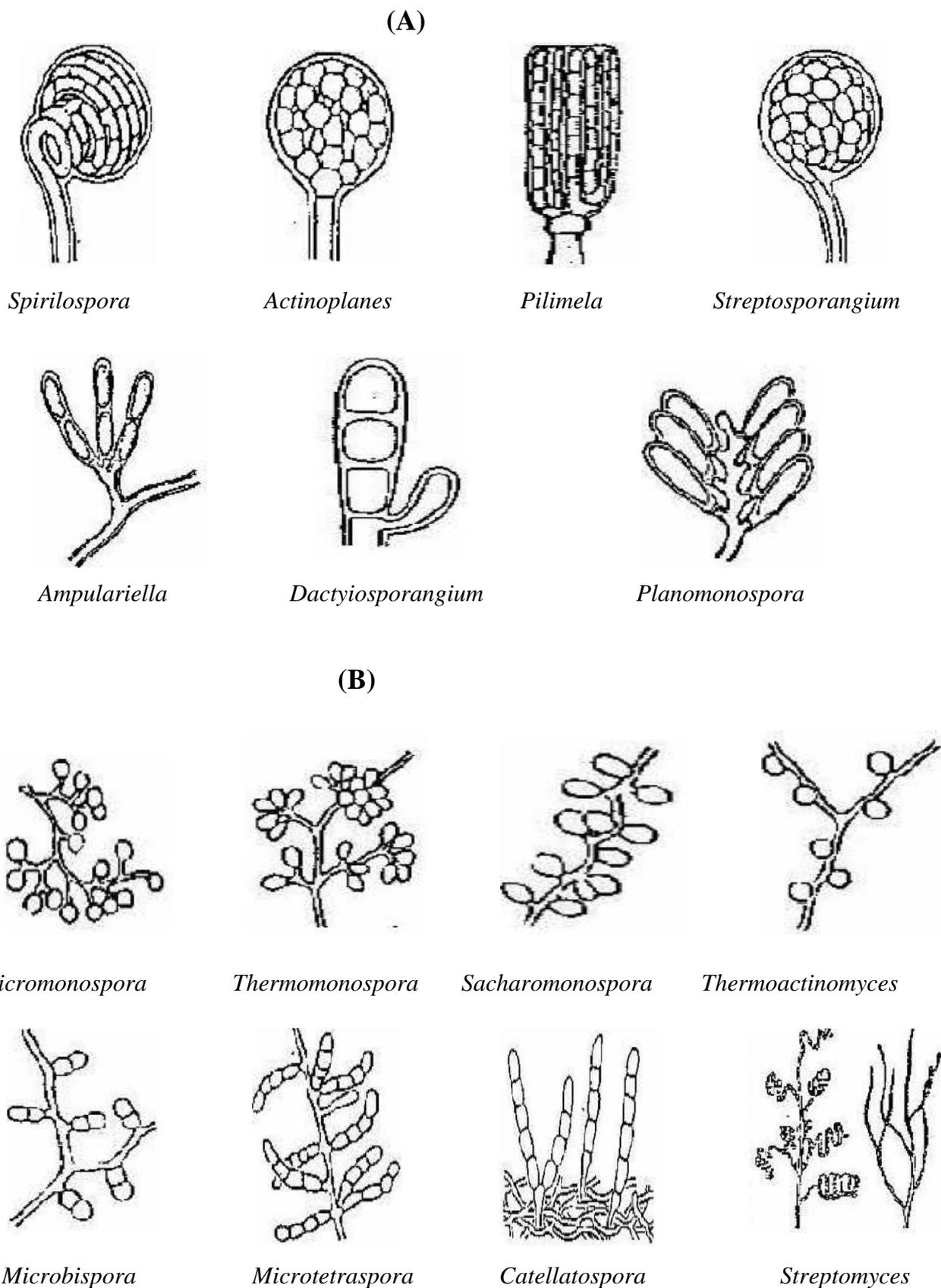
#### **I.5.4.2. Endospores :**

Sont produites par des actinomycètes thermophiles. Elles naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe. (**Sykes et Skinner, 1973**). On parle ainsi de « sporulation entérothaliq ue », caractéristique des genres *Planomonospora* et *Dactilosporangium*, lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentérale.

On parle de « sporulation holothaliq ue », caractéristique du genre *Thermoactinomyces*, lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient, au moins en partie, de toutes les couches pariétales de l'hyphe parentérale, recouverte ou non d'une enveloppe (**Kitouni, 2007**).

Tout comme les endospores bactériennes du genre *Bacillus* (une bactérie à coloration de gram positive qui a des spores très résistantes à la chaleur), les spores des *Thermoactinomyces* contiennent de l'acide dipicolinique à une concentration de 6.5 à 7 % ( poids/ poids) , ce qui est inférieur à la concentration retrouvée dans les spores de *Bacillus*.

Cet acide, probablement situé dans la partie central de la spore, est un composé unique qui est retrouvé exclusivement chez les cellules non végétatives et il pourrait jouer un rôle dans la résistance des spores à la chaleur. De grandes quantités d'ions calcium et magnésium sont également associées à la présence de cet acide dans la spore. Les endospores des thermoactinomycètes peuvent rester viables dans le sol pendant de nombreuses décennies (**Sykes et Skinner, 1973**).



**Figure 4** : Différents chaînes de spores chez les Actinomycètes ; spores endogènes (A) et spores exogènes (B) (Breton *et al.*, 1989).

### I.5.5. Les facteurs qui contrôlent la sporulation :

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement : la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

Les facteurs propres aux microorganismes sont d'ordres génétiques et biochimiques. De nombreux travaux ont mis en évidence des biorégulateurs codés par des gènes chromosomiques et plasmidiques influant de manière complexe sur la sporulation ainsi que sur la biosynthèse de métabolites secondaires (**Grafe et al ., 1984 ; Khokhlov, 1986** )

### I.5.6. Thermorésistante des spores :

En générale, la plus part des spores d'actinomycètes comme par exemple les *Streptomyces* ne résistent pas à des températures supérieures à 50°C en chaleur humide et à 70°C en température sèche (**Larpent et Sanglier, 1989**). Il existe cependant plusieurs autres espèces qui résistent à des températures plus élevées (**El-Nakeeb et Lechevalier, 1963**). C'est le cas de l'espèce *Actinomyces invulnerabilis*, que les spores ne se détruisent qu'à une température de 130°C, le traitement à 120°C inhibe seulement leur germination. Les spores des genres thermophiles tel que *Thermoactinomyces*, *Saccharomonospora*, ou thermotolérants tel que *Pseudonocardia*, *Microbispora*, etc., sont également résistantes à des températures élevées (**Lechevalier et Lechevalier, 1970**).

### I.5.7. Structures particulières :

Certains actinomycètes forment des structures particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie.

Ainsi les sclérotés trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.

Les Synnemata, appelés également corémies sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema* .

Les sporanges sont des sacs contenant des spores (**Theilleux, 1993**) .Les conidies sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations :

- une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
  - une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
  - chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
  - longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
  - conidies rassemblées dans des synnemata {spores mobiles et qui peuvent être libérées}
- (**carlotti et al ., 1994**).

### **I.6. Génétique et structure d'ADN:**

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**).

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E.coli*, la durée de répllication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujet à des réarrangements. A la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse. Ces derniers jouent un rôle de régulation dans la synthèse des antibiotiques. Il est rare de trouver des gènes codant pour la biosynthèse d'antibiotiques localisés sur le plasmide. Ils sont normalement chromosomiques, regroupés en plusieurs unités de transcription, ils ont pour voisinage des gènes de régulation spécifiques (**Larpen et Sanglier, 1989**).

### **I.7. Classification des actinomycètes :**

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes.

L'ordre des actinomycètes qui comptait 5 genres en 1948, 9 en 1958, en comprenait 37 en 1974 selon la 8<sup>ème</sup> édition du *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology* (**Gottlieb, 1973**).

En 1989, l'application de critères chimiotaxonomiques a permis de répartir les actinomycètes en sections (de 26 à 33) sur la base de caractères morphologiques et biochimiques.

Selon la classification présentée dans le *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* édité en 1994, les actinomycètes sont répartis en 8 groupes (de 22 à 29) avec l'introduction de

nouveaux genres et avec une division plus précise du groupe (22) des *Nocadioformes* en 4 sous-groupes et du groupe (26) des *Maduromycetes* en 2 sous-groupes.

En 1997, **Stackebrandt et al .**, proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui reposent uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80% de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Sphaerobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955) (**Stackebrandt et al ., 1997**).

### **I.7.1. La classe "*Actinobacteria*" :**

Actuellement et selon la classification du « Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », seconde édition 2004 (**Garrity et al ., 2004**), le phylum *Actinobacteria* (bactéries à Gram positif et G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « *Actinobacteria* ». (**Stackebrandt et al., 1997**).

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes (**Tableau N°3**): *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Actinobacteridae*. Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae*, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae*.

**Tableau N°3:** La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (**Garrity et al ., 2004**).

Phylum <i>Actinobacteria</i>					
Classe <i>Actinobacteria</i>					
<b>S/CI</b>	<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteridae</i>	<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
<b>S/CI</b>	<i>Actinobacteridae</i>				
<b>Ordres</b>	<i>Bifidobacteriales</i>				<i>Actinomycetales</i>

Ordres <i>Actinomycetales</i>				
<b>S/O</b> <i>Actinomycineae</i>	<b>S/O</b> <i>Micrococcineae</i>	<b>S/O</b> <i>Corynebacterineae</i>	<b>S/O</b> <i>Micrimonosporineae</i>	<b>S/O</b> <i>Propionibacterineae</i>
<b>Famille</b> <i>Actinomycetaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	<b>Famille</b> <i>Micromonosporineae</i>	<b>Familles</b> <i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardiodaceae</i>
<b>S/O</b> <i>Pseudonocardineae</i>	<b>S/O</b> <i>Streptomycineae</i>	<b>S/O</b> <i>Streptosporangiineae</i>	<b>S/O</b> <i>Frankineae</i>	<b>S/O</b> <i>Glicomycineae</i>
<b>Familles</b> <i>Pseudonocardaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	<b>Familles</b> <i>Streptomycetaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosoriaceae</i>	<b>Familles</b> <i>Glycomycetaceae</i>

S/C : sous-classe, S/O : sous-ordre

**I.7.2. Les genres et espèces de l'ordre *Actinomycétales* :**

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques et chimiotaxonomiques .

**I.7.2.1. Caractères morphologiques :**

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien. Ainsi que la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sclérotés, de sporanges ou de synnémata .

**I.7.2.2. Caractères chimiotaxonomiques :**

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie.

**I.7.2.2.1. Acides aminés de la paroi :**

Les *Streptomyces* et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique) contrairement à l'ensemble des autres *Actinomycétales* .

**I.7.2.2.2. Glucides :**

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*.

Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinomadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora* .

**I.7.2.2.3. Acides gras :**

Les acides gras les plus communs, chez les actinomycètes appartiennent soit au groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone. La présence d'acides mycoliques est caractéristique des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus*.

#### I.7.2.2.4. Les acides nucléiques :

Les déterminations portent sur le pourcentage de guanine et cytosine, sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN (obtenus par la digestion par les enzymes de restriction), sur le taux d'hybridation ADN - ADN ou ADN - ARN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont sans relation. Audelà de 70 % de similitude (l'hybridation ADN-ADN), deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce. Le séquençage de l'ARNr 16S, constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985 b**).

#### I.8. Les actinomycètes aérobie pathogène :

Ils peuvent provoquer deux maladies importantes chez l'homme: l'actinomycétome et la nocardiose. Tandis que l'actinomycétome est le plus souvent provoqué par *Nocardia brasiliensis*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* et *Streptomyces somaliensis*. Dans la nocardiose, l'agent impliqué est surtout, *Nocardia asteroides* (**Pirouz et al ., 1999**). L'évolution des deux maladies est lente et insidieuse, et peut aboutir à des lésions spectaculaires des tissus mous et des os. Dans la nocardiose, les filaments bactériens se rencontrent sous forme libre. Cependant dans l'actinomycétome, on trouve des grains constitués de filaments agrégés. La couleur et la taille des grains peuvent orienter le diagnostic histologique (**Beaman et Beman, 1994**). *Nocardia asteroides* et *Nocardia brasiliensis* sont les deux espèces d'actinomycètes les plus fréquemment isolées dans un laboratoire clinique (**Wallace et al ., 1995**).

##### I.8.1. L'actinomycétome :

###### I.8.1.1. Généralités :

C'est une infection sous-cutanée chronique due aux actinomycètes aérobies : *Noardia sp*, *Actinomadura madurae*, *Actinomadura pelletieri* et *Sreptomyces somaliensis*. L'homme s'infecte par inoculation directe des microorganismes sous la peau au cours d'un traumatisme cutané ou après piquûre par des épines souillées. Son évolution est lente et progressive (**Sy et al ., 2003**). Elle est localisée le plus souvent aux membres inférieurs. En effet, dans les zones rurales surtout où les ouvriers travaillent avec les pieds nus, elle peut se présenter dans divers emplacements du corps tels que le bras, le dos et la nuque (**Abd El Bagui et al ., 2003; Lum et Vandmal, 2003**).

Elle débute par un nodule sous-cutané indolore, qui augmente lentement de taille et peut devenir purulent et nécrotique. Du pus peut s'écouler des fistules qui se forment. Une

inflammation granulomateuse se produit avec tuméfaction des régions environnantes. L'actinomycétome reste généralement localisé mais peut s'étendre à travers les tissus. Avec le temps une ostéomyélite destructive peut s'installer (**Freland et al ., 1995**).

#### **I.8.1.2. Le traitement :**

Le traitement de l'actinomycétome est avant tout chirurgical avec drainage et nettoyage des lésions infectieuses. Parfois, une amputation peut être nécessaire en cas de lésions très évoluées. Une antibiothérapie prolongée, à base de sulfamides, est généralement établie en complément au traitement chirurgical (**Simonet, 1991 ; Carey et al., 2001 ; McNeil et al.,1990**).

#### **I.8.2. La nocardiose :**

##### **I.8.2.1. Généralités :**

La nocardiose est une maladie infectieuse provoquée par les espèces appartenant au genre *Nocardia*. L'infection peut être, pulmonaire, cérébrale, cutanée ou disséminée (**Beaman et Beman, 1994; Conville et al ., 2004**). Ces infections sont surtout contractées par inhalation, plus rarement par voie digestive ou cutanée (**Avril et al, 1992; Saubolle et Sussland, 2003**).

C'est une infection opportuniste observée chez des patients immunodéprimés (**Holtz et al ., 1985; Lerner, 1996**). Elle peut être associée à d'autres pathologies opportunistes comme l'aspergillose (**Holt et al ., 1993**), la pneumocystose (**Perschak et al, 1991**). Une corticothérapie au long cours est le facteur prédisposant majeur (**Curry 1980 ; Presant et al. 1973**), mais aussi, les traitements immunosuppresseurs lors de transplantation d'organes, les cancers et les collagénoses (**Filice, 1993**).

##### **I.8.2.2. Le traitement :**

La majorité des souches est résistante à la vancomycine, au chloramphénicol, à l'érythromycine et à la clindamycine. La plupart des souches de *Nocardia* sont résistantes aux pénicillines par production d'une b-lactamase inhibée par l'acide clavulanique (**Kitzis et al ., 1985; Ambaye et al., 1997**).

Cependant, la grande majorité des souches est sensible aux sulfamides, surtout le sulfaméthoxazole dont l'action peut être renforcée par le triméthoprime (**Collins, 1988**). La durée de l'antibiothérapie, de six à douze mois, est conditionnée par la localisation, la sévérité de l'infection et le statut immunitaire du malade (**Collins, 1988; Lerner, 1996**).

*Les Métabolismes*  
*D'actinomycètes*

## II. Métabolisme d'actinomycète

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**).

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Ces bactéries filamenteuses sont connues pour la richesse de leur métabolisme secondaire (**Strub, 2008**).

### II.1. Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire correspond à l'ensemble des voies cataboliques, et anabolique qui fournissent à l'organisme l'énergie et les molécules nécessaires à sa croissance. Ce métabolisme primaire des actinomycètes est semblable à celui des autres organismes. L'action des enzymes du catabolisme conduit à la dégradation des nutriments et sources d'énergie plus ou moins complexes. Les produits finaux du catabolisme sont utilisés pour former des intermédiaires primaires "glucides, aminoacides, acides gras, nucléotides, vitamines et polymères essentiels" qui en dérivent "polysaccharides, protéines, lipides, acides nucléiques ainsi que les coenzymes". Ces métabolismes primaires ou généraux essentiels forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général. Certaines de ces métabolites primaires constituent la matière première du métabolisme secondaire.

Les activités cataboliques et de biosynthèse interdépendantes sont en général soumises à une régulation équilibrée évitant toute accumulation de produits finaux ou intermédiaires. Les mécanismes de contrôles les plus importants sont : l'induction par les substrats, la rétro-inhibition sur les activités enzymatiques, la répression de la synthèse des enzymes, la répression catabolique et la régulation de l'ATP. Comme la plupart des bactéries, les actinomycètes utilisent des sources de carbone constituées par des oses, des oligoholosides, des polyosides. Il en est de même pour les sources d'azote généralement constituées par des acides aminés, des protéines, des nitrates et aussi le phosphate et le sulfates fournissent respectivement phosphore et soufre.

Au-delà de ces sources courantes, les actinomycètes ont la capacité de dégrader ou de transformer des composés hydrophobes parmi lesquels on peut noter (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**).

- \* Des hydrocarbures et assimilés : alcanes, alcènes, alcynes, cyclanes, terpènes ;
- \* Des composés azotés non aromatiques: nitriles, amides, hétérocycles ;
- \* Des composés aromatiques: hydrocarbures, amines aromatiques, phénols.

## II.2.Métabolisme secondaire

Les métabolites secondaires sont définis comme des composés de faible poids moléculaire, non essentiels à la croissance du microorganisme producteur. La production de ces métabolites est souvent associée à la croissance des microorganismes correspondant à la phase stationnaire de la courbe de croissance (**Demain, 1995**).

Une des propriétés la plus significative des Actinomycètes est leur aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique important (**Higashide, 1984; Vining, 1992**). Tant les activités biologiques que les structures chimiques se révèlent d'une grande diversité comme le montre le **Tableau N°4 (Sanglier et al ., 1993)** .

**TableauN°4:** Métabolites secondaire produit par les actinomycètes selon les groupes chimiques (1990-1994) (**Sanglier et Trujillo, 1997**).

Métabolites	<i>Streptomyces</i> et genres apparentés	<i>Actino-planaceae</i>	<i>Maduro-mycetes</i>	<i>Nocardio-formes</i>	Autres genres
Sucres	24	1	1	10	6
Lactones macrocycliques	97	30	0	12	15
Quinones	31	0	1	1	0
Peptides	84	1	2	11	8
Système hétérocyclique	165	15	32	3	7
Squelette aliphatique	2	0	0	0	0
Squelette aromatique	123	12	5	6	0
Chaine aliphatique	24	0	0	0	0
Autres	211	27	34	0	13
<b>Total</b>	761	86	75	40	49

### II.3. Les 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 des enzymes. La grande majorité des métabolites isolés sont originaires des espèces de *Streptomyces* (Anderson et Willington, 2001; Sanglier et al., 1993). Les *Streptomyces* produisent 70 à 80% des substances bioactives naturelles connues à application pharmaceutique ou agrochimique (Berdy, 2005 ; Manteca et al., 2008). Continuellement de nouveaux métabolites à différentes activités biologiques sont isolées des souches *Streptomyces* (Getha et al., 2005 ; Dastager et al., 2009) .

Les actinomycètes sont la source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine et dannomycine), insecticides (mikkomycine), pesticides ( antimycine A) herbicides ( phinotricine) et de substances ayant des activités immunosuppressives et immunostimulantes (la rapamycine ) **Tableau N°05.**

**Tableau 05 :** Bioactivités des métabolites isolés à partir d'actinomycètes (1990-1994)  
(Sanglier et Trujillo, 1997).

Métabolites Bio-actifs	Streptomyces et genres apparentés	Actinoplanaceae	Maduromycetes	Nocardioformes	Autre genre
Anti-Gram positifs	225	18	41	44	19
Anti-Gram négatifs	83	2	11	21	9
Antifongiques	97	1	30	2	6
Anti-levures	69	1	25	2	6
Anti-parasitaires	30	-	8	-	4
Herbicides	23	-	2	-	3
Insecticides	28	-	-	10	-
Antiviraux	35	-	8	20	4
Anticancéreux	179	11	10	5	8
Inhiboteurs d'enzymes	126	1	15	3	2
Agents pharmacologiques	160	2	10	7	4
Autres	48	6	4	3	5
<b>Total</b>	<b>1103</b>	<b>42</b>	<b>164</b>	<b>118</b>	<b>70</b>

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des actinomycètes. Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents (protéases). Les glycosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases) et animales (chitinases) (**Tsujibo et al., 2003**). Certaines de ces enzymes peuvent avoir des applications médicales (neuraminidases, estérases et oxydases des stérols) elles sont utilisées en biologie moléculaire (endonucléases de restriction) (**Mitsuiki et al., 2002**).

Les tableaux N° 06 et 07 illustrent quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les actinomycètes

**Tableau N° 06 :** Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes

Actinomycètes	producteurs Antibiotiques	Références
<b>1/Les agents antibactériens</b>		
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostomycine	<b>Takahashi et al., 2003</b>
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicine	<b>Jinenez et al., 2009</b>
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigne	<b>Inoue et al., 2007</b>
<i>Streptomyce lindensis</i>	Rétamycine	<b>Inoue et al., 2007</b>
<i>Marinispora sp.</i>	Marinomycine	<b>Sturdiková et Sturdik, 2009</b>
<i>Verrucosipora sp.</i>	Abyssomycine	<b>Sturdiková et Sturdik, 2009</b>
<b>2/ Les agents antifongiques</b>		
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine	<b>Hwang et al., 2001</b>
<i>Streptomyces humidus</i>	Phénylacétate	<b>Hwang et al., 2001</b>
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine	<b>Hwang et al., 2001</b>
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B	<b>Kitouni ,2007</b>
<b>3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes</b>		
<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	Spinosad. Insecticide neurotoxique	<b>Williamson et al., 2006</b>
<i>Actinomadura sp</i>	Herbicides. <b>Exemple 1.</b> 2,4-Dihydro-4-( $\beta$ -Dribofuranosyl)- 1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one	<b>Schmitzer et al., 2000</b>
<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<b>Exemple 2.</b> Herbimycine	<b>Omura, 1992</b>

**Tableau N° 07** : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes

Molécules bioactives	Actinomycète producteur	Références
<b>1/ Les agents anti parasitaires</b>		
Trioxacarcine	<i>Streptomyces sp</i>	<b>Maskey et al., 2004</b>
Prodiginine	<i>Streptomyces coelicolor</i>	<b>Williamson et al., 2006</b>
<b>2/ Les agents anti viraux</b>		
9-β-D-arabinofuranosyladénine	<i>Streptomyces antibioticus</i>	<b>Madigan et al., 1997</b>
Panosialine	<i>Streptomyces sp</i>	<b>Aoyagi et al., 2006</b>
<b>3/ L'agent hypocholestérolémique</b>		
Rapamycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<b>Higashide, 1984</b>
<b>4/ Les agents anti tumoraux</b>		
Asterobactine	<i>Nocardia asteroides</i>	<b>Gottlieb D., 1973</b>
Salinosporamide A	<i>Salinispora tropica</i>	
Mechercharmycine	<i>Thermoactinomyces sp</i>	<b>Demain A.L. 1995</b>
Marinomycine	<i>Marinospora sp</i>	
Borrelidine	<i>Streptomyces sp</i>	
IB-00208	<i>Actinomadura sp</i>	<b>Lacey , 1997</b>
<b>5/ Les agents immunostimulateurs</b>		
Rubratin	<i>Nocardia rubra</i>	<b>Lousif ,2011</b>
Bestatine	<i>Streptomyces olivoreticuli</i>	
FR-900494	<i>Kitasatospora kifunense</i>	
<b>6/ Les agents immunosuppresseurs</b>		
Pentalenolactone	<i>Streptomyces filipinensis</i>	<b>Lousif, 2011</b>
Brasilicardine A	<i>Nocardia brasiliensis</i>	
<b>7/ Les enzymes à application thérapeutique (anti-tumorale)</b>		
L- asparaginase	<i>Streptomyces spp</i>	<b>Lousif ,2011</b>
L- glutaminase	<i>Streptomyces olivochromogenes</i>	<b>Lousif, 2011</b>

### II.3.1. La production d'antibiotique chez les Actinomycètes

La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les Actinomycètes, 50 à 75% des souches isolées en sont productrices et sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde (**Okami, 1988**).

Un antibiotique (du Grec *anti* : « contre », et *bios* : « la vie ») est défini comme une substance naturelle produite par les microorganismes dont même de très faibles concentrations à l'action d'inhiber la croissance de bactéries (action bactériostatique) ou de les tuer (action bactéricide) (**Decre et Courvalin, 1995**). Il peut être antibactérien, antifongique, anticancéreux, antiviral ou antiparasitaire. Beaucoup d'antibiotiques naturels ont été structurellement modifiés en laboratoire pour augmenter leur efficacité formant la classe des antibiotiques semi-synthétiques (**Madigan et Martinko, 2007**).

Le premier et le plus important produit des *Streptomyces* est les antibiotiques (**Watve et al., 2001**). C'est en 1944 que le microbiologiste américain S. Waksman a décrit pour la première fois la streptomycine qui est un antibiotique produit par un Actinomycète tellurique, *Streptomyces griseus*. Ce fut le premier médicament qui se révéla efficace contre la tuberculose.

A partir de 1955 le genre *Streptomyces* devient, et va rester le grand fournisseur d'antibiotiques nouveaux (**Hwang et al., 2001 ; Marinelli, 2009**), bien que d'autres structures nouvelles soient isolées d'autres genres comme *Actinomadura* et *Micromonospora* (**Sanglier et al., 1993**).

Depuis les années 1950-1960, de multiples dérivés semi-synthétiques d'antibiotiques naturels (par exemple les fluoroquinolones) sont rendus plus actifs par ajout de divers substituant, et des antibiotiques entièrement synthétiques (par exemple l'azithromycine) sont commercialisés par les entreprises pharmaceutiques. Il s'agit toutefois uniquement de molécules appartenant à des classes d'antibiotique déjà connues. En effet, au cours des trente dernières années, les connaissances scientifiques n'ont permis la découverte que d'une seule nouvelle famille d'antibiotiques non naturels, celle des oxazolidinones (**Swaney et al., 1998**). Aujourd'hui, les traitements antibactériens à base d'antibiotiques, sont appelés "antibiothérapies".

Plus de 60 substances à activité antibiotique produites par des espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais également dans celui de l'agriculture et de l'industrie (**Madigan et Martinko, 2007**).

Nous citons simplement ici quelque exemple d'antibiotiques issus d'actinomycètes et préparés industriellement (Levreau et bouix, 1993). (Tableau N°08)

**Tableau N°08 :** Exemple d'antibiotiques produits par des actinomycètes (Levreau et Bouix, 1993).

Principales classes structurale d'antibiotiques	Exemples d'antibiotiques
Aminocyclitols	Gentamicine, paromomycine, streptomycine
Ansamycines	Rifamycine
Anthracyclines	Daunorubicine, Mitomycine
B-Lactamines	Céphamycine, Thiénamycine
Macrolides	Avermectine, Josamycine, spiramycine
Nucléotides	9-B-D-arabinofuranosyladénine, Blastidicine
Peptides	Actinomycine, Nosiheptide, pristinamycine
Polyènes	Amphotéricine, Nystatine
Polyéthers	Lasalocide, Monensine, Narasine
Tétracyclines	Chlortétracycline, Oxytétracycline
Divers	Chloramphénicol

### II.3.1.1. La classification des antibiotiques :

Les antibiotiques qui sont utilisés à l'heure actuelle peuvent être classés selon plusieurs critères :

**Origine :** élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique).

**Mode d'action :** paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.

**Spectre d'activité :** liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large).

**Nature chimique :** très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (exemple : cycle  $\beta$  lactame).

Les antibiotiques peuvent être distingués selon la base du type d'activité qu'ils exercent. Un antibiotique bactéricide qui lyse les bactéries et un antibiotique à effet bactériostatique qui inhibe la croissance bactérienne en ralentissant puis arrêtant la multiplication (**Mohamedi, 2001**).

Selon cette activité (**Zeghilet, 2009**) on peut classer les antibiotiques en de grandes familles lesquelles sont représentées dans le tableau suivant:

**Tableau N° 09:** classification des antibiotiques (Zeghilet , 2009).

<b>Antibiotiques</b>	<b>Effet</b>
<p><b>Les Bétalactamines</b> Les pénicillines G. Exemple : penicilline G, oraciline, extencilline</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Les pénicillines M. Exemple : bristopen, orbenine</li> <li>• Les aninopénicillines exemple : totapen, penglobe, clamoxyl, augmentin</li> <li>• Les carboxypénicillines exemple : ticarpen C</li> <li>• Les aciluréidopénicillines exemple : baypen, piperilline</li> <li>• Les carbapénèmes exemple : tienam</li> <li>• Les monobactams exemple : azactam- les céphalosporines</li> </ul>	<b>Bactéricide</b>
<p><b>Les macrolides</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Vrais ex : erythrocline, joeacine, rovamycine</li> <li>• Apparentés: <ul style="list-style-type: none"> <li>○ Lincosanides ex : lincocine, dalacine</li> <li>○ Synergistines ex: pyostacine,</li> </ul> </li> </ul>	<b>Bactériostatique</b>
<b>Les aminosides</b> Ex : amiklin, gentalline, nebcine, netromycine	<b>Bactéricide</b>
<b>Les sulfamides</b> Ex : adiazine, bactrim	<b>Bactériostatique</b>
<b>Chloramphénicol</b> Ex : tifomycine	<b>Bactériostatique</b>
<b>Les imidazoles</b> Ex : flagyl, tiberall	<b>Bactéricide</b>
<b>Les polymyxines</b> Ex: colimycine	<b>Bactéricide</b>
<b>Les tétracyclines</b> Ex : vibramycine, vibraveineuse	<b>Bactériostatique</b>
<b>Les glycopeptides</b> Ex : targocid, vancocine, vancomycine	<b>Bactéricide</b>
<b>Les quinolones</b> Ex : ciflox, noroxine, oflocet, peflacine	<b>Bactéricide</b>
<p><b>Antibiotiques divers</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Acide fusidique ex : fucidine</li> <li>• Rifamycine ex : rifocine</li> <li>• Fosfomycine ex : fosfocine</li> <li>• Inhibiteurs des bétalactamases ex : betamaze</li> </ul>	

### II.3.1.2. Mécanisme d'action des antibiotiques

Les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire nos cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte.

Le mode d'action des antibiotiques varie d'une classe à une autre. On distingue des antibiotiques :

#### II.3.1.2.1. Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

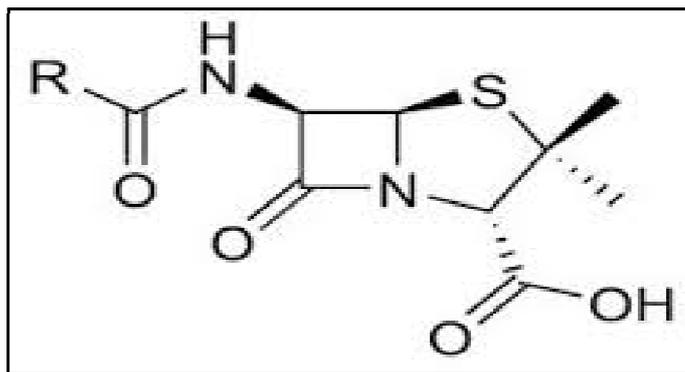
Le peptidoglycane, est le constituant principal, est en effet spécifique du monde bactérien lui conférant sa forme et sa rigidité. Il occupe une position différente selon que la bactérie est à Gram+ ou à Gram -. (**Green, 2002**). La synthèse du peptidoglycane débute dans le cytoplasme de la bactérie, se poursuit dans la membrane cytoplasmique et se termine dans la paroi déjà formée. Un certain nombre d'enzymes intervient dans la synthèse du peptidoglycane dont les plus importantes sont les transpeptidases, les transglycosylases et les carboxypeptidases (**Roher et Berger-Bachi, 2003**).

Trois classes d'antibiotiques sont concernées : les  $\beta$ -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine :

- **Structure et mode d'action des  $\beta$ -lactamines**

Les  $\beta$ -lactamines se fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique, les PLP (protéines liant la pénicilline), ce sont des enzymes impliquées dans la synthèse du peptidoglycane : les transpeptidases, les carboxypeptidases et les transglycosylases. Les  $\beta$ -lactamines bloquent leur fonctionnement inhibant ainsi la formation du peptidoglycane.

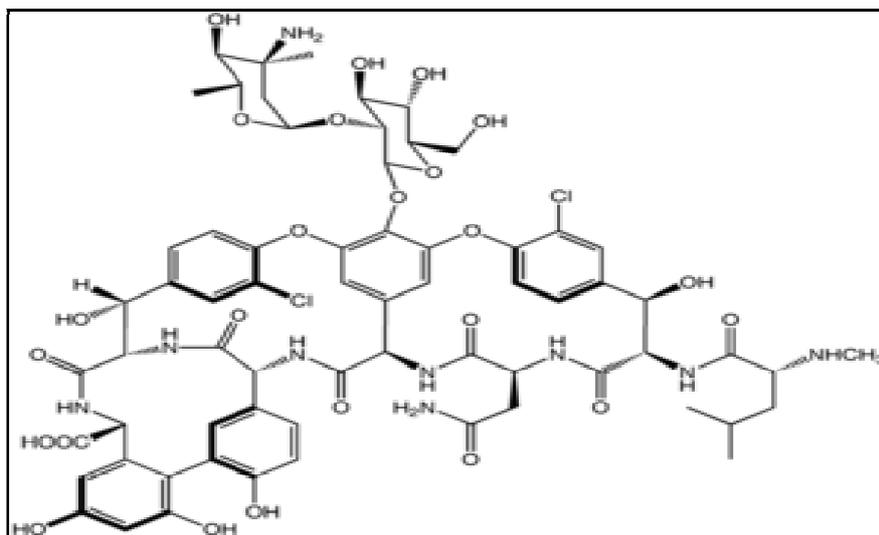
Les  $\beta$ -lactamines exercent un effet bactériostatique en empêchant les bactéries de se multiplier. Le blocage de la multiplication cellulaire est suivi d'une lyse bactérienne. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne **Figure N° 05 (Calamita et Doyle, 2002)**.



**Figure N° 05:** Similarité de structure entre les antibiotiques à noyau  $\beta$ -lactamimes (ici la pénicilline) (Calamita et Doyle, 2002).

- **Structure et mode d'action des glycopeptides**

Les glycopeptides sont des molécules complexes, constitués d'un heptapeptide cyclique sur lequel vient se fixer des sucres (**Figure N° 06**). Les glycopeptides sont au même titre que les  $\beta$ -lactamines des inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Leur fixation sur la membrane cytoplasmique entraîne une inhibition de la transglycosylase et la transpeptidase nécessaire à la bonne synthèse du peptidoglycane (Prescott *et al.*, 2007).



**Figure N° 06:** Structure d'un glycopeptide (la vancomycine) (Prescott *et al.*, 2007).

• Structure et mode d'action de la fosfomycine

La fosfomycine est un acide phosphonique (**Figure N° 07**), elle agit sur les étapes précoces de la synthèse du peptidoglycane, en bloquant la formation de l'acide N-acetyl muraminique, l'un des constituants essentiel du peptidoglycane de la paroi bactérienne. Cet antibiotique est isolé la première fois à partir de *Pseudomonas syringae*. Depuis, tous les organismes producteurs de fosfomycine appartiennent aux *Streptomyces* (Oiwa, 1992).

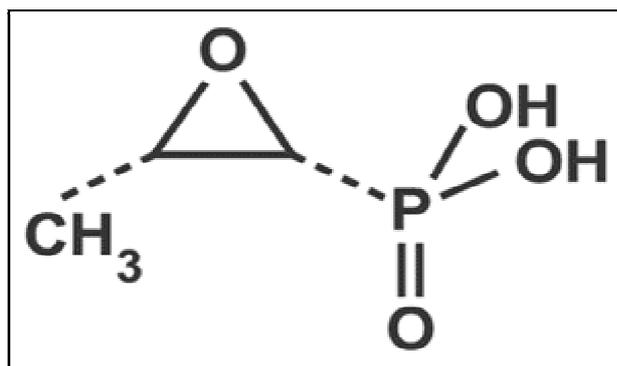


Figure N° 07. Structure de la fosfomycine (Oiwa, 1992).

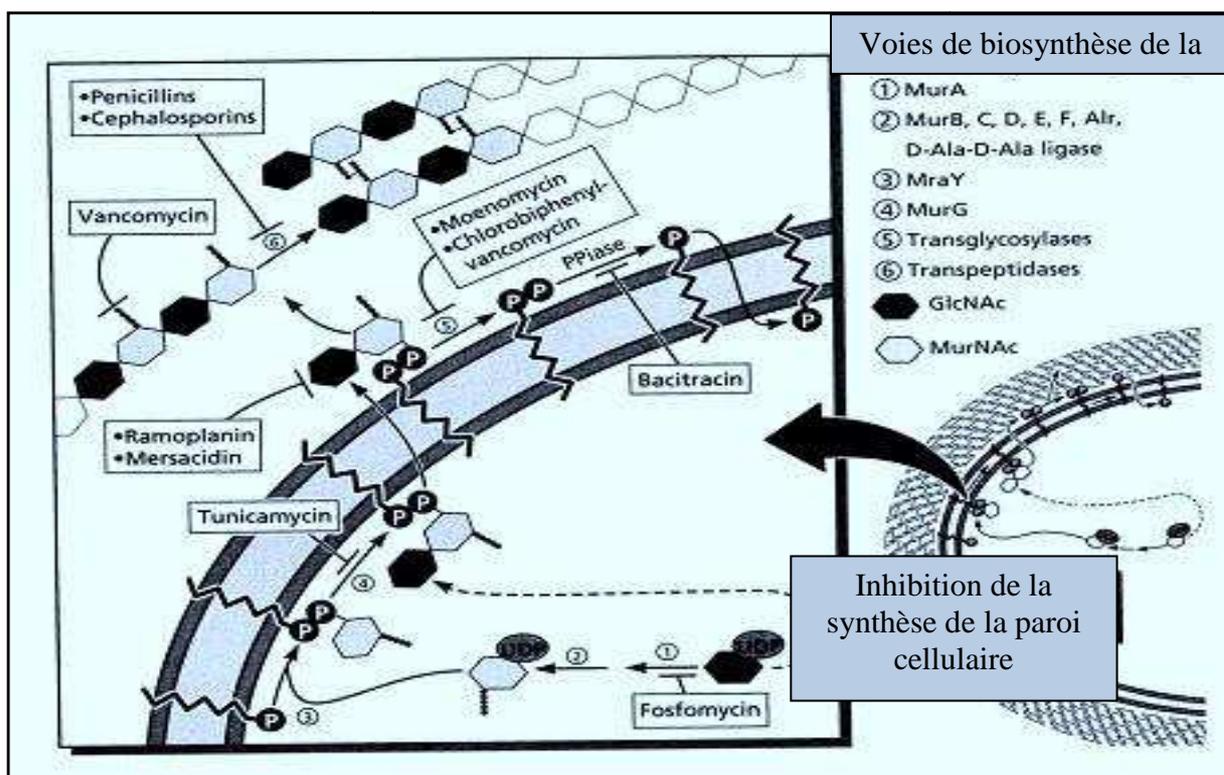


Figure N° 08 : Principaux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane (Walsh *et al.*, 2001)

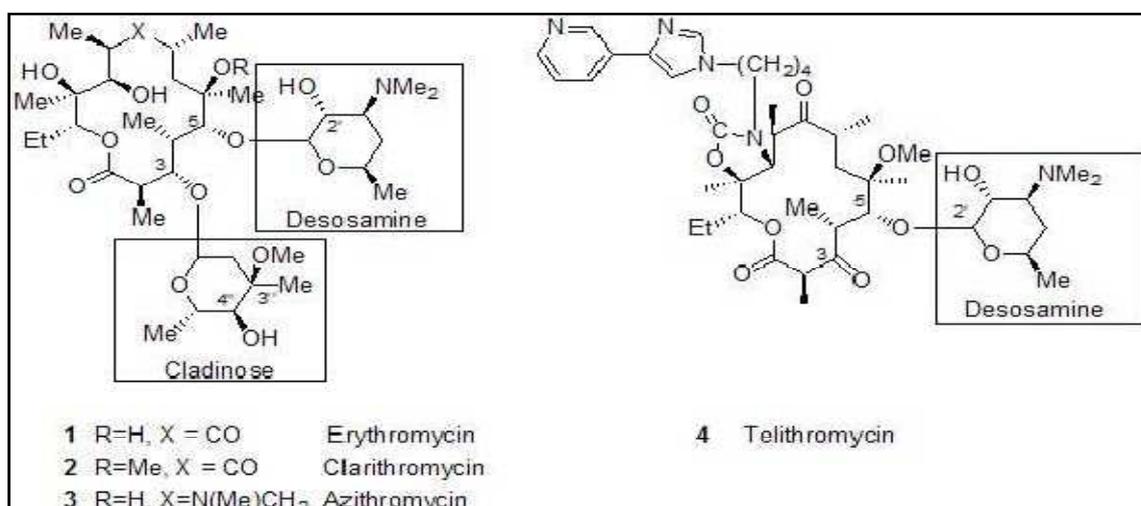
### II.3.1.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Les antibiotiques les plus importants sont les macrolides, les aminoglycosides, les tétracyclines et les phénicolés. La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien. Il faut donc, pour toutes ces molécules, qu'elles traversent le peptidoglycane et les diverses membranes pour arriver dans le cytoplasme et atteindre leur cible: ribosome.

- **Structure et mode d'action du macrolide**

Le nom « macrolide » vient de macro (grand) et olide (lactone ou ester intracyclique). Il existe des macrolides semi synthétiques obtenus par modification chimique des produits naturels **Figure N° 09 (Labro, 2002)**.

Les macrolides agissent sur la synthèse protéique, la fixation de ces molécules sur la sous unité 50S du ribosome entraîne l'inhibition de l'élongation du peptide en formation (**Canu et Leclerq, 2001**).

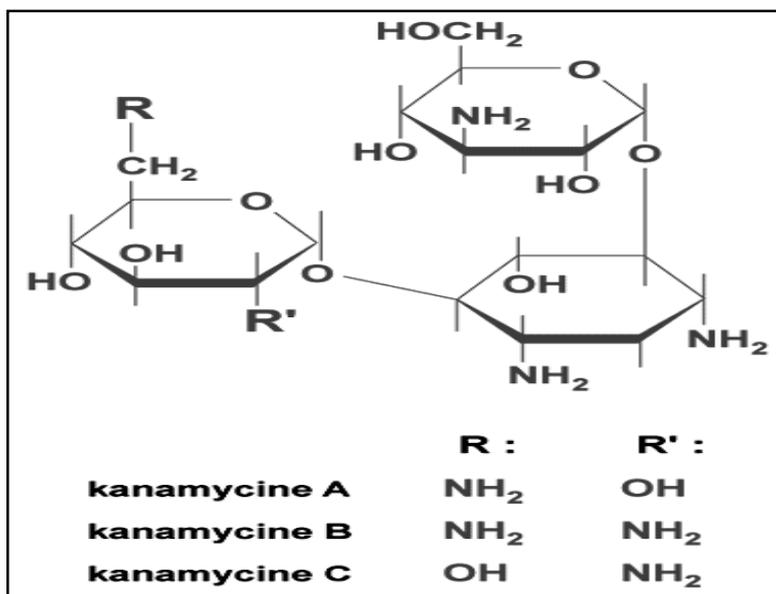


**Figure N° 09.** Structure des macrolides (**Labro, 2002**)

- **Structure et mode d'action des aminoglycosides**

Les aminoglycosides ont pour cible cellulaire principale la sous unité 30S du ribosome bactérien, après fixation, ils faussent le mécanisme de lecture de l'ARN m à traduire favorisant l'incorporation d'acides amines erronés dans les protéines au cours de synthèse, ce qui provoque

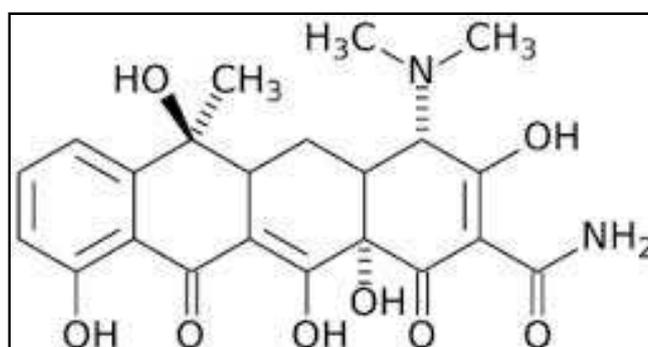
une accumulation des protéines incorrectement traduites dans la bactérie **Figure N°10** (Carter *et al.*, 2000 ; Madigan et Martinko, 2007).



**Figure N°10.** Structure de la kanamycine (aminoglycoside) (Herman, 2005).

- **Structure et mode d'action tétracyclines**

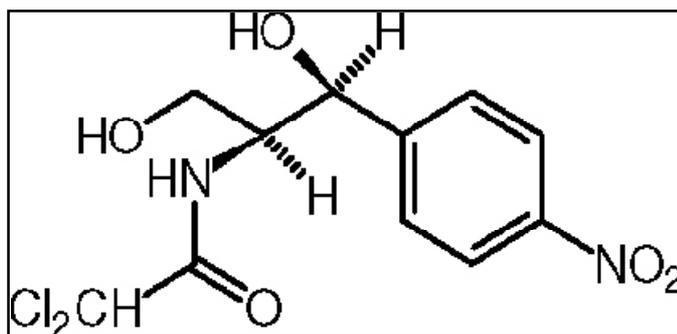
Les tétracyclines possèdent une structure particulière, elles sont formées de 4 cycles accolés sur lesquels sont fixées diverses chaînes latérales (**Figure N°11**). Ces antibiotiques inhibent la synthèse protéique en empêchant la liaison de l' aminoacyl-ARNt à la sous unité 30S du ribosome bactérien. Ce sont des composés bactériostatiques à très large spectre. Néanmoins, leur usage est aujourd'hui limité par l'émergence de résistances (Prescott *et al.*, 2007).



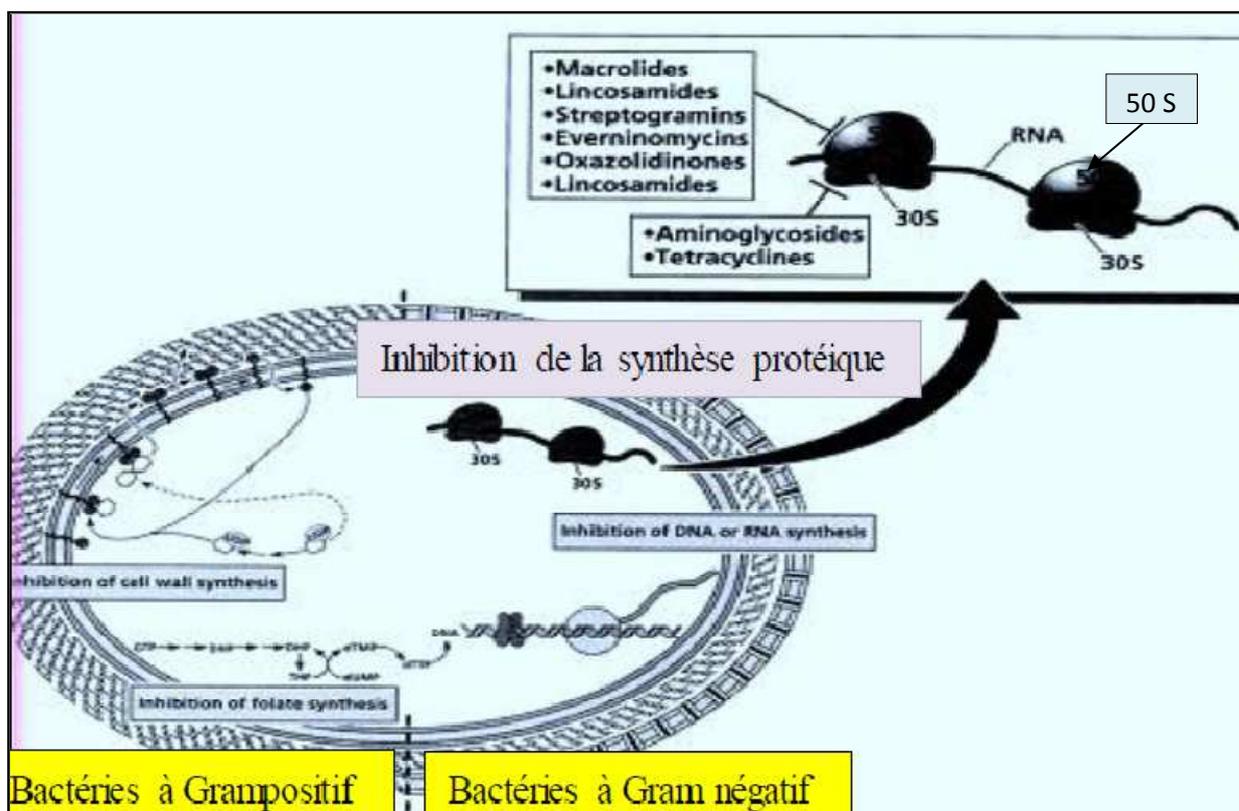
**Figure N°11.** Structure des tétracyclines (Prescott *et al.*, 2007).

• **Structure et mode d'action phenicoles**

Ce sont des dérivés de l'acide dichloroacétique, porteur aussi d'un phényle substitué. Le plus connu est le chloramphenicol (**Figure N° 12**). Comme les macrolides, les phenicoles se fixent à la sous unité 50S du ribosome bactérien. Ils inhibent la synthèse des protéines en empêchant la réaction de transpeptidation (**Prescott *et al.*, 2007**).



**Figure N°12:** Structure de Chloramphenicol (**Prescott *et al.*, 2007**).



**Figure N° 13 :** Principaux antibiotiques inhibiteurs des synthèses protéiques (**Walsh *et al.*, 2001**).

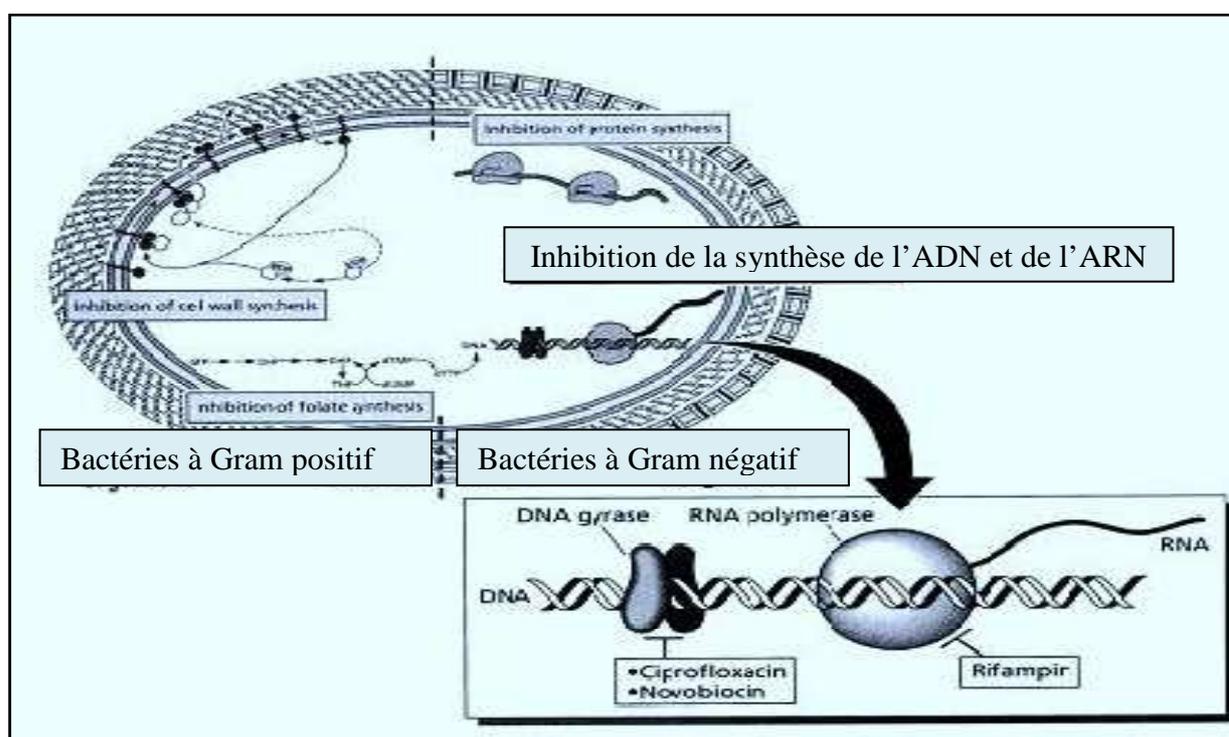
### II.3.1.2.3. Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques

La structure des acides nucléiques bactériens ou fongiques (ADN ou ARN) ne présente aucune particularité. Par conséquent, les antibiotiques qui agissent à ce niveau sont toxiques pour toutes les cellules. Parmi ces antibiotiques on peut distinguer (**Figure N° 14**):

\* Les quinolones qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN telle que les topoisomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation en toute synthèse (**Smaoui, 2010**).

\* Novobiocine (glycoside) qui inhibe la réplication de l'ADN.

\* La rifamycine (ansamycine) qui bloque la synthèse de l'ARNm par inhibition de l'ARN polymérase bactérienne (**Kieser et al., 2000 ; Tortora et al., 2003**).



**Figure N° 14** : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques

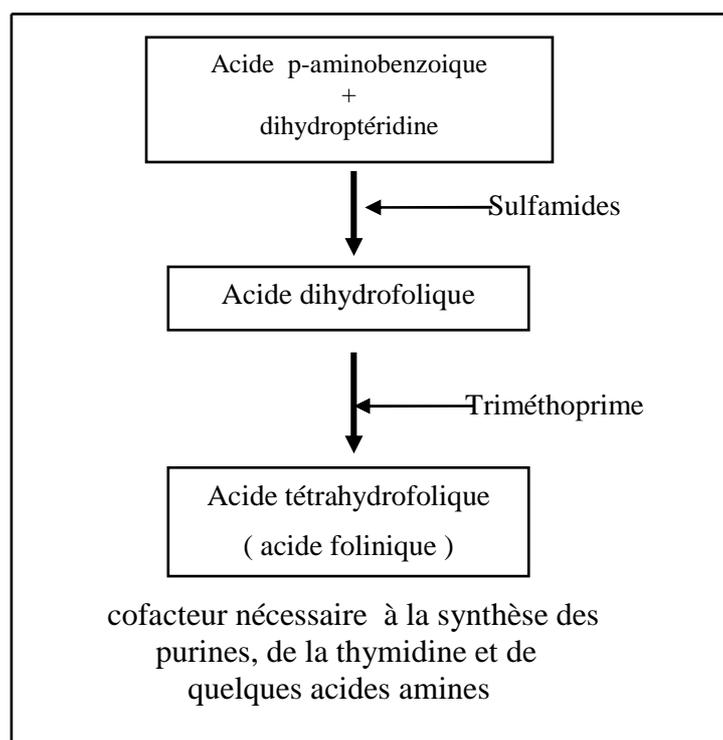
(Walsh et al., 2001)

### II.3.1.2.4. Action sur les métabolismes intermédiaires

Dans cette classe on peut citer (**Figure N°15**) :

\* Sulfamides analogue structuraux de l'acide para-aminobenzoïque, inhibe l'action de la dihydrofolate synthétase.

\* Triméthopirime inhibe l'action de la dihydrofolate réductase (**Azéle, 2002**).



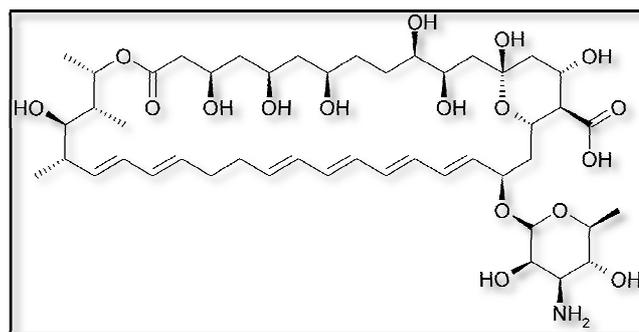
**Figure N°15:** Principaux antibiotique inhibiteurs des métabolismes intermédiaires (**Azéle, 2002**).

### II.3.1.2.5. Action sur la membrane cytoplasmique

L'exemple type est celui des polymixines. Ces antibiotiques agissent à la manière des détergents cationiques sur les bicouches lipidiques des membranes biologiques. Interagissant avec la partie anionique du lipide A (endotoxine) de la membrane externe des bactéries Gram-, les polymixines sont transférées jusqu'à hauteur de la membrane cytoplasmique et en perturbent les fonctions de perméabilité. Le  $Ca^{++}$  et le  $Mg^{++}$  antagonisent leur activité. Leur action est bactéricide (**Yala et al., 2001**).

### II.3.1.2.6. Antibiotiques antifongiques

Ces substances sont inactives sur les bactéries mais offre un spectre antifongique caractéristique. Les *Streptomyces* produisent les polyènes qui possèdent un cycle lactone, c'est pourquoi on parle aussi de « macrolides polyeniques », la nystatine (**Figure N°16**) est la molécule la plus connue qui agit sur la membrane cytoplasmique fongique (**Prescott et al ., 2007**).



(**Figure N° 16**) : Structure de la nystatine (**Prescott et al ., 2007**) .

### II.3.1.3 La résistance aux antibiotiques

La connaissance du mode d'action des antibiotiques est nécessaire à la compréhension des mécanismes de résistance. La résistance bactérienne à un antibiotique est d'origine génétique. Les gènes de résistance se trouvent soit dans le chromosome (résistance chromosomique), soit dans un élément mobile, comme les plasmides, les éléments transposables ou les intégrons (résistance extra chromosomique). La résistance peut être soit naturelle, soit acquise (**Sylvie, 2009**).

#### II.3.1.3.1 La résistance naturelle

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce. On peut citer, à titre d'exemple, les résistances naturelles des entérobactéries et de *Pseudomonas* aux macrolides, des bactéries à Gram – à la pénicilline et à la vancomycine, des bactéries à Gram + à la colimycine, et des streptocoques aux aminosides. Ce type de résistance est détecté dès les premières études réalisées afin de déterminer l'activité d'un antibiotique et contribue à définir son spectre antibactérien (**Yala et al ., 2001**) .

### **II.3.1.3.2 La résistance acquise**

C'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe, d'antibiotiques. Ce nouveau gène peut être obtenu soit par mutation au niveau du chromosome qui est un phénomène rare soit l'acquisition de gènes par un autre micro-organisme (mécanisme le plus fréquent) (Yala *et al.*, 2001).

#### **II.3.1.3.2.1 Mutation chromosomique spontanée**

La mutation chromosomique spontanée constitue un mécanisme de résistance aux antibiotiques chez environ 10 à 20 % des bactéries.

Les gènes de résistance se situent alors dans le chromosome de la bactérie. Une mutation n'affecte qu'un caractère, et la résistance ne concerne généralement qu'un antibiotique ou qu'une famille d'antibiotiques ayant le même mécanisme d'action. L'utilisation d'une association de deux ou de plusieurs antibiotiques semble pouvoir prévenir l'émergence de mutants résistants. Par exemple, la résistance à la rifampicine et aux quinolones résulte toujours d'une mutation (Sylvie, 2009).

#### **II.3.1.3.2.2 Acquisition de gènes de résistance par un autre organisme**

La résistance bactérienne par acquisition d'information génétique exogène représente la majorité des cas isolés en clinique et s'observe aussi bien chez les bactéries à gram positif qu'à gram négatif. L'acquisition de nouveau matériel génétique peut se faire soit par échange direct de matériel chromosomique, soit par échange d'éléments mobiles. Dans ce dernier cas, les gènes de résistance se trouvent dans un fragment d'ADN bactérien situé à l'extérieur et sur certains éléments mobiles du chromosome, tels les plasmides. Cette forme de résistance est transférable d'une bactérie à l'autre et même à des bactéries d'espèces différentes (Sylvie, 2009).

### **II.3.1.4. 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 physicochimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers (**Strub, 2008**).

#### **II.3.1.4.1. 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 entre autres chez les actinomycètes (**Strub, 2008**).

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.3.1.4.2. Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques**

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

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

#### **II.3.1.4.3. Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques**

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

#### **II.3.1.4.4. Influence des sources de phosphate sur la production des antibiotiques**

Si la croissance des micro-organismes réclame des concentrations en phosphate variant entre 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.3.1.4.5. 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**).

#### **II.3.1.5. Application des antibiotiques issus des Actinomycètes**

Si les antibiotiques issus des actinomycètes sont connus d'abord pour leurs applications médicales, ils présentent un intérêt significatif dans les domaines de la santé animale, de l'élevage et de l'agriculture (**Berdy, 2005**).

##### **II.3.1.5.1. En santé humaine**

Parmi les nombreux antibactériens issus d'Actinomycètes, on peut citer comme exemple :

- Les gentamicines produites par *Micromonospora spp.* Administrées par voie parentérales pour traiter des infections sévères des germes à Gram-négatif.
- La rifampicine, un dérivé de la rifamicine produite par *Nocardia mediterranei*, utilisée dans le traitement de la tuberculose.

Outre les antibactériens, l'activité de ces molécules peut s'exercer vis-à-vis des champignons. L'antifongique le plus exploité en thérapeutique est la nystamine, un tétraène extrait de culture de *S. noursei* (Ouhdouch, 2001).

L'antiparasitaire bien connu est la spiramycine, un macrolide antibactérien de *S. ambofaciens*, efficace dans le traitement de la toxoplasmose (Ninet, 1960).

L'antivirus qu'on peut mentionner est la 9-Z-arabinofuranosyladine de *S. antibioticus*, synthétisé par voie chimique et actif sur le virus de l'herpès (Ninet, 1960).

Plusieurs anthracyclines et quinones dont la daunorubicine de *S. coeruleorubidus* sont utilisés dans le traitement de plusieurs types de cancer, dont les leucémies en particulier.

#### II.3.1.5.2. En santé animale et élevage :

Les antibiotiques issus des Actinomycètes sont utilisés en élevage comme adjuvants pour l'alimentation animale en stimulant la croissance et en améliorant le rendement alimentaire ou en protégeant les jeunes en début d'élevage. C'est le cas des bambermycines utilisées chez le porc et les volailles.

Les antibiotiques sont aussi largement utilisés en médecine vétérinaire, comme l'ivermectine produite par *Streptomyces avermitilis*, qui est un anthelminthique (contre les nématodes chez les animaux) (Stapley et Woodruff, 1982).

#### II.3.1.5.3. En agriculture :

Les activités des antibiotiques destinés à l'agriculture s'étendent à différents domaines comme le contrôle des maladies des végétaux (insecticides, herbicides et régulateurs du métabolisme végétal). La blasticidine S est un puissant fongicide de type nucléotidique, connue pour son activité sur *Piricularia oryzae*, pathogène chez le riz (Demain, 1995).

### II.3.2. Les actinomycètes producteurs d'enzymes de biodégradation

Deux des 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 les enzymes, qui après les antibiotiques sont les produits les plus importants des actinomycètes. L'action des enzymes du catabolisme conduit à la dégradation des nutriments et sources d'énergie plus ou moins complexes (Lopes et al., 1999).

### II.3.2.1. Enzymes de biodégradation des composés organiques naturels

Les actinomycètes sont des microorganismes saprophytes, qui jouent un rôle dans la dégradation de la matière organique naturelle et donc un rôle dans le recyclage des biopolymères complexes comme la cellulose, la lignocellulose, la pectine et le xylane par la production d'enzymes extracellulaires qui sont d'une importance majeure dans l'industrie (**Tableau N°7**).

La dégradation de ces biopolymères par les enzymes peut être le résultat d'un mécanisme radicalaire (**oxydation biologique**) ou d'un changement chimique (**hydrolyse biologique**).

Dans le cas de l'oxydation biologique, les enzymes réagissent directement avec l'O<sub>2</sub> comme les **cytochromoxidases** qui sont des enzymes actives dans la chaîne respiratoire. La plupart du temps, l'oxygène est incorporé directement au substrat (cas des **oxygénases**). Parfois, il joue le rôle d'un accepteur d'hydrogène (cas des oxydases) (**Chandra et Rustgi, 1998**).

Quant à l'hydrolyse biologique, les **protéases** catalysent l'hydrolyse des protéines en acides aminés. Les polysaccharides, par exemple les amidons, sont dégradés enzymatiquement pour libérer des sucres (**Dierckx et Dewettink, 2002 ; Ralet et al., 2002**).

### II.3.2.2. Enzymes de biodégradation des composés organiques de synthèse

Les capacités biodégradatrices des actinomycètes ne se limitent pas seulement aux composés organiques naturels mais concernent également des substrats organiques plus difficiles à dégrader car peu solubles dans l'eau. Il s'agit des hydrocarbures (chaînes hydrocarbonées), de phénols et d'autres composés récalcitrants (**Kimura et Urushigawa, 2001 ; Lin et al., 2005**).

Le principal mécanisme enzymatique pour l'assimilation et/ou la détoxification de substrats organiques peu dégradables est l'oxydation enzymatique par les **monoxygénases** ou **dioxygénases**: il y a formation de groupes polaires qui permettent d'augmenter la solubilité de nombreux substrats organiques peu soluble dans l'eau (hydrocarbures ou hydrocarbures aromatiques polycycliques) et de faciliter ainsi leur assimilation (**Cerniglia, 1992 ; Pelmont, 1993 ; Bossert et Kosson, 1997**). C'est également, le mécanisme de biodégradation des composés nitroaromatiques (**Nishino and Spain, 1997**) et des substrats organochlorés tels que les chlorobiphényles (**PCB**) (**Focht, 1997**).

Pour ces derniers, la déchlorination bactérienne a été démontrée en condition anaérobie avec formation de métabolites facilement biodégradables en aérobiose. Il existe actuellement un

certain nombre de travaux qui s'intéressent à la prédiction informatisée de la biodégradabilité à partir des réactions connues de biodégradation (**Bollag, 1974 ; Niemi and Veith, 1989**) (**Tableau N°10**).

**Tableau N°10** : Exemples d'enzymes employées dans différents secteurs industriels (**Kirk et al** ., 2005).

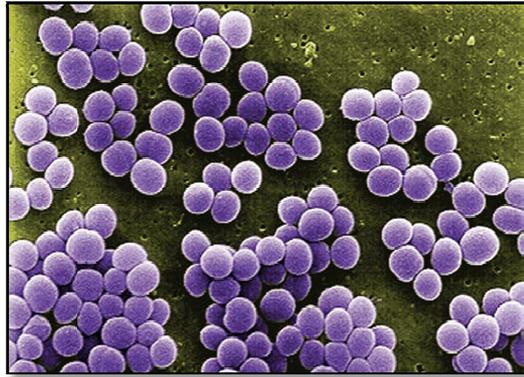
Secteur industriel ou Classe d'utilisation	Enzyme	Application
Industrie des détergents	-Cellulase -Amylase -Protéase -Lipase	-Nettoyage, clarification des couleurs. -Enlèvement des tâches d'amidon - Enlèvement des tâches protéiques -Enlèvement des tâches des graisses
Industrie des boissons	- Pectinase - Amylase	- Dépectinisation, Clarification des jus, broyage. - Traitement des jus.
Produits laitiers	-Pectine méthyl estérase -Protéase - Lipase	-Affermissement de produits à base de fruits. -Lait caillé. - Aromes des fromages
Industrie textile	- Cellulase -Pectate lyase	-Assouplissement du coton -Lessivage
Pâte à papier	-Cellulase - Xylanase	- Désencrage, améliorant de drainage, Modification de la fibre. - Augmentation du blanchiment

## II.4 .Caractéristiques des microorganismes testés :

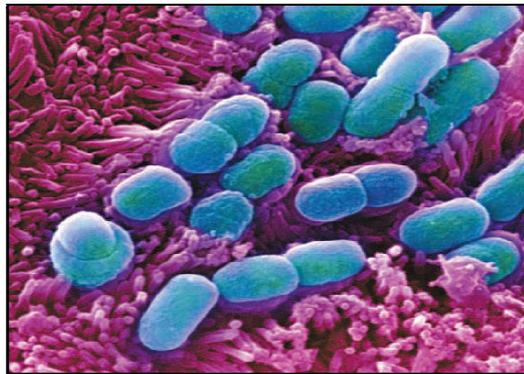
Caractéristiques des souches testées sont résumé dans le tableau suivant :

**Tableau N°11:** Caractéristiques des souches testées

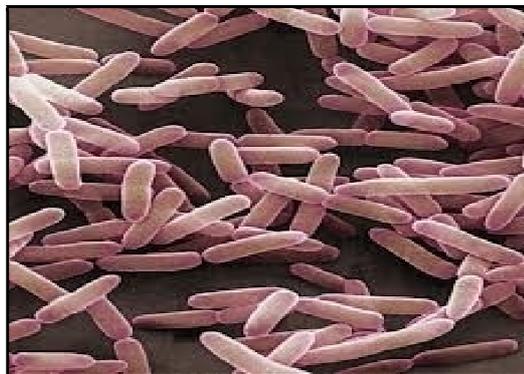
Souches	Caractéristiques des souches	Maladies causées
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923) <b>Figure N°17</b>	Cocci, Gram +, groupe en amas (forme grappe de raisin), aéro-anaérobie facultatifs, sporulé, non capsule, immobile, catalase +, oxydase - (Camille, 2007).	Dues à l'ingestion d'entérotoxine préformées dans l'aliment : Abcès, vomissements, diarrhées, hypotension, déshydratation et absence de fièvre (Camille, 2007).
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922) <b>Figure N°18</b>	Bacille, Gram -, mobile, aéro-anaérobie facultatifs, parfois capsulé, capable de fermenter le lactose et produire de l'indole (Jacques, 2001).	- Gastro-entérite, diarrhée, - Infections urinaires, - Méningites, septicémie (Jacques, 2001).
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC10876) <b>Figure N°19</b>	Cocci ou bâtonnet, Gram +, sporulé, catalase +, mobile, aérobie stricte ubiquitaire, produisant des acides à partir des glucides avec nitrates (Camille, 2007).	- Méningites, otite, , - Infection urinaires, bactériémie, - Pneumonie, endocardite, panophtalmie (Camille, 2007).
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 25922) <b>Figure N° 20</b>	Bacille, Gram+, mobile, non sporulé, non capsulé, catalase +, oxydase - aéro-anaérobie facultatifs, ubiquitaire (Nassif, 2003).	- Septicémie, - Méningites, - Méningo-encéphalites (Nassif, 2003).
<i>p. aeruginosa</i> (ATCC 27853) <b>Figure N°21</b>	Bacille, Gram-, mobile, aérobies stricts, oxydase positif,( Flandrois, 2002). Ubiquitaire, parfois entouré d'une pseudo-capsule appelés slime (Avril et al ., 2000).	- Infection cutanées, endocardite, , - Septicémie, Infection nosocomiales chez les personnes fragilisées (Camille , 2007) .



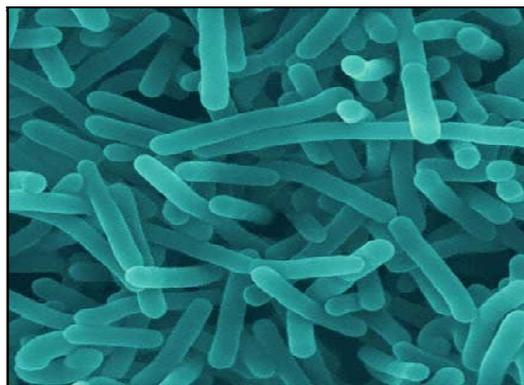
**Figure N° 17:** *Staphylococcus aureus* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).



**Figure N° 18 :** *Escherichia coli* vue au microscope électronique et coloré artificiellement (Camille, 2007).



**Figure N° 19:** *Bacillus subtilis* vue au microscope électronique et colorée artificiellement (Camille, 2007).



**Figure N°20 :** *Listeria monocytogenes* vue au microscope électronique et colorée  
Artificiellement (Camille, 2007).



**Figure N°21:** *Pseudomonas aeruginosa*, vue au microscope électronique et colorée  
artificiellement (Camille, 2007).

*Matériel*

*Et*

*Méthode*

### III.1. Objectif

L'objectif principal de notre travail consiste à la recherche de la nature biochimique de la molécule bioactive secrétée par des actinomycètes et impliquée dans l'inhibition de certaines bactéries pathogène. La réalisation de ce but nécessite une revivification des souches d'actinomycètes préalablement pré identifiées et testées pour leur pouvoir antibactérien.

Les molécules bioactives des actinomycètes sont, en générale, des métabolites secondaires qui nécessitent le lancement d'une fermentation pour récupérer une quantité suffisante à la réalisation des différents tests de caractérisation. Les substances bioactives doit subir une extraction avec le solvant et la technique adéquate.

La caractérisation de la molécule va se dérouler dans un ordre chronologique qui permet de choisir les meilleures techniques de séparation et de l'identification à savoir :

- Le spectre UV-Visible de l'extrait brut pour le choix de système de séparation adéquat ;
- Une CCM pour la séparation de différents composés de l'extrait brut obtenus par fermentation ;
- Une bioautographie des produits de la CCM pour déterminer le composé bioactif ;
- L'utilisation de différentes techniques chromatographiques et spectroscopiques disponibles afin de déterminer les caractéristiques et/ou la structure de la molécule bioactive.

Ce travail a été réalisé aux laboratoires pédagogiques de l'université Dr. MOULAY TAHAR –Saida, Faculté des sciences Département de biologie, pendant la période allant de février à mai 2015.

Les souches d'actinomycètes servant d'objet de ce travail ont été isolées d'échantillons de sols arides de la région d'Ain Loarak, Sebkha de Bougtob et 'El Bayadh, dans des travaux antérieurs (Naimi, 2014).

### **III.2. Revivification des souches d'actinomycètes**

Les souches d'actinomycètes (A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26, A32), conservées sur gélose inclinée GLM et Bennett, sontensemencées dans les mêmes milieux (GLM et Bennett) (annexe). Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 21 jours.

#### **III.2.1. vérification de la pureté des souches :**

Dans un premier temps, les colonies d'actinomycètes sont repérées d'après leur aspect **macroscopique** caractéristique (colonies dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect **microscopique** (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique (G× 10).

##### **III.2.1.1. Macromorphologie et caractères cultureux**

Ces caractères sont déterminés sur les milieux, Bennett et GLM. Les milieux sont stérilisés et répartis en boîtes de Pétri qui sont incubées 24 h à 28° C avant leur utilisation. Après 7, 14 et 21 jours d'incubation, l'importance de la croissance de chaque souche, le développement et la pigmentation du mycélium aérien et de substrat (dos de la colonie) sont déterminés.

S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes, autre que la couleur brun-noir caractéristique des pigments mélanoides, la couleur est notée (Shirling et Gottlieb, 1966).

##### **III.2.1.2. Micromorphologie**

###### **a). Observation au faible grossissement**

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'Agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (G×40) (Suzuki, 2001).

**b). Observation au fort grossissement**

Est une observation au microscope optique ( $G \times 100$ ), après coloration de Gram. La coloration de Gram est une double coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer. Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.

**La procédure de cette coloration**

- ✓ Préparer et fixer sur une lame un frottis bactérien à la flamme d'un bec bunsen ;
- ✓ Coloration par violet de gentiane ou cristal violet .Laissez agir de 30 secondes à 1 min.  
Rincez à l'eau distillée ;
- ✓ Mordançage au lugol (solution d'iode iode-iodurée ) pendant 1 min. puis rinçage à l'eau distillé .
- ✓ Décoloration par l'alcool pendant 30 s, rincé à l'eau ;
- ✓ Recoloration à la fuschine pendant 1 min, rinçage à l'eau puis séchage ;
- ✓ Observation avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 ( $G \times 100$ )

Le mécanisme de cette coloration est connu. Le violet de gentiane se fixe sur des composants cytoplasmiques et après ce temps de coloration, toutes les bactéries sont violettes. Chez les bactéries à Gram -, la paroi, riche en lipides, laisse passer l'alcool qui

Décolore le cytoplasme alors que, chez les bactéries à Gram +, la paroi constitue une barrière imperméable à l'alcool et le cytoplasme demeure coloré en violet (**Camille, 2007**).

**III.3. conservation des souches d'actinomycètes**

Les colonies d'actinomycètes sur les deux milieux Bennett et GLM, pures, numérotées, sont conservées selon différentes méthodes :

-Conservation en gélose inclinée à 4 °C après incubation de 21jours à 28°C un repiquage est effectué tous les deux mois (**Hilali et al ., 2002**).

- A la congélation à -20 °C après culture liquide et en présence du glycérol (20 %, v/v) utilisé comme cryo-protecteur pour une durée plus longue.

- Les tubes contenant des cultures en gélose inclinée sur milieu GLM sont remplis de L'huile de paraffine, cette technique permet une bonne conservation, aussi longue que celle de la congélation (**Boudemagh, 2007**).

### III.4. Confirmation de l'identité et de la pureté des souches indicatrices

Les souches ont été ramenées gracieusement par monsieur **Hala .N** de la Wilaya de Tlemcen (Souches de références). Elles sont identifiées au niveau de laboratoire de l'université Moulay Tahar de Saida par différentes méthodes.

#### III.4.1. Observation macroscopique

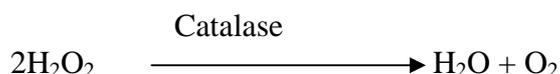
La confirmation de la forme et la couleur de chaque bactérie.

#### III.4.2. Observation microscopique

Observation sous microscope optique après une coloration de Gram pour chaque bactérie.

#### III.4.3 .Teste biochimique

Parmi ces tests on a réalisé le test de catalase (la dégradation de  $H_2O_2$  en  $H_2O$  et oxygène qui se manifeste par un dégagement gazeux (**Camille, 2007**)).



#### III.4.4. Test d'antibiogramme

La résistance aux antibiotiques a été déterminée par la méthode de diffusion des disques (Bio-Rad, France). Un inoculum de  $10^6$  UFC/ml a été préparé pour chaque souche bactérienne.

Les souches bactériennes (*S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis*, *E. coli*, *p. aeruginosa*). Sont ensemencées en surface sur le milieu Muller Hinton. Les antibiotiques (Code, charge du disque) utilisés pendant le test de sensibilité sont : Amikacine (AK, 30 $\mu$ g/ml), Streptomycine (S, 10 $\mu$ g/ml), Erythromycine (E, 15 $\mu$ g/ml), Kanamycine (K, 30 $\mu$ g/ml), Tobramycine (TOB, 10  $\mu$ g/ml), Clindamycine (DA, 2 $\mu$ g/ml), Ampicilline (AM, 10 $\mu$ g/ml) sont déposés sur la surface de la culture. La lecture est effectuée après 18- 24 heures d'incubation à 37°C. (**Elazhari et al., 2010**).

### III.5. Recherche de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes isolés est recherchée contre des bactéries testes qui ont été ramenées gracieusement par Mr Hala .N de (laboratoire antibiotique antifongique : physico-chimie synthèse et activité biologique département de biologie faculté de science de la terre et de la vie des sciences de la terre et de l'univers université de Tlemcen).

Elles sont constituées de bactérie à Gram positifs (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Bacillus subtilis* ATCC10876). Et aussi des bactéries à Gram négatifs *Escherichia coli* ATCC 25922, *p. aeruginosa* ATCC 27853). (**Tableau N° 11**).

#### III.5.1. Revivification des bactéries testes

Chaque bactéries teste est revivifiée dans 9ml de bouillon nutritif puis incubée à 37°C pendant 18 à 24 heures. La turbidité du bouillon nutritif indique le développement de souches cultivées.

A partir des cultures préparées précédemment, les souches sont repiquées. Pour chaque souche, une ansée de cette culture estensemencée en stries sur une boîte de Pétri contenant du milieu gélose nutritif solide. Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C pendant 18 à 24 heures afin d'obtenir des colonies jeunes et isolées (**Andriambololona, 2010**).

##### III.5.1.1. Préparation des inocula des bactéries-tests

A partir d'une culture de 18h sur gélose nutritif (GN) une suspension de chaque bactéries-testes en eau physiologie (0.9 % NaCl) est préparée.

La densité cellulaire de chaque suspension par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 McFarland (une densité optique égale à 650nm) de façon à obtenir une concentration finale de  $10^6$  UFC/ ml après incorporation dans le milieu Mueller Hinton (**Cavalla et Eberlin, 1994**).

#### III.5.2. Méthodes des cylindres d'agar

Les souches d'actinomycètes sontensemencées en stries serrées à la surface des milieux Bennett, GLM. Après 14 jours incubation à 28°C, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont prélevés, déposés à la surface du milieu Mueller Hinton (Annexe) préalablementensemencé parécouvillonnage avec les bactéries tests. Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à 4 °C pendant 4 heures pour permettre un pré diffusion des substances bioactives

élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Les diamètres sont alors mesurés (Petrosyan et al., 2003).

### III.6. Production et extraction de métabolites secondaires

#### III.6.1.Extraction à partir du milieu solide

Les souches étudiées sont ensemencées en stries serrées sur milieu AF. Après incubation à 28°C pendant 8 à 14 jours, la gélose est fragmentée puis repartie dans des flacons stériles contenant 25 ml du solvant méthanol, Les flacons sont ensuite laissés à température ambiante pendant 2 heures. Avec agitation vigoureuse. Les extraits sont filtrés en éliminant les cellules vivantes et récupérées par centrifugation à 11000 g pendant 10 mn puis testés par la technique des disques (Boughachiche, 2012).

#### III.6.2. Technique des disques

Les extraits organiques du surnageant et du mycélium ainsi que les extraits organiques obtenus à partir des milieux géloses sont testés par cette technique. 25 µl à une concentration de 50mg/ml sont déposés par fractions sur des disques de papier Whatman N°3 (6 mm de diamètre) stériles et sont séchés pendant 15 minutes dans une étuve à 37°C. Les disques sont, ensuite, déposés sur Mueller-Hinton préalablement ensemencée avec les souches-test qui sont *Staphylococcus aureus* (ATTC 25923), *Escherichia coli* (ATTC 25922), *Bacillus subtilis* (ATCC10876), *L. monocytogenes* (ATTC 25922).

Des disques témoins, imprégnés de solvants purs (méthanol) et séchés dans les mêmes conditions, sont également testés. Les boîtes sont incubées à 37°C après une pré-diffusion de deux heures à +4°C. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 à 48 heures d'incubation (Barry et al., 1970).

### III.7. Caractérisation de la molécule bioactive

#### III.7.1. Etude du spectre UV-Visible

Tous les extraits actifs (présentant une activité antibactérienne) sont solubilisés dans le méthanol. Le spectre d'absorption de ces extraits, en lumière UV-Visible entre des longueurs d'ondes allant de 200 à 600 nm, a été effectué en utilisant un spectrophotomètre. Les résultats

sont présentés sous forme de graphes en valeurs d'absorbance en fonction des différentes longueurs d'ondes (**Hacène et al ., 1994 ; Lemriss et al., 2003**).

### III.7.2. Chromatographie sur couche mince (CCM)

#### Principe

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'absorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille en plastique ou en aluminium. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant. Chaque tache détectée ou révélée est caractérisée par sa référence frontale donnée par la relation suivante (**Randerath, 1971 ; Vernin, 1970**). (**Andriambololona, 2010**).

$$Rf = \frac{X}{Y}$$

**Rf** : Référence frontale.

**X** : Distance parcourue par le produit

**Y** : Distance parcourue par le solvant

#### Mode opératoire

Dix microlitres de chaque extrait méthanolique des souches actinomycétales A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26, A32 sont déposés à l'aide d'une micro seringue sur des plaques de CCM en plastique (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 :

- Toluène-acétone (6 :4)
- Toluène- acide acétique (8 :2)
- N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1 )
- Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4)
- Toluène- méthanol (5 :5) (**Boughachiche, 2012**).
- Déchlorométhane –méthanol (8,2) (**Andriambololona, 2010**).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance a partir du point de dépôt. Après élimination du solvant, les chromatogrammes sont observés sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et  $365$  nm) (**Boughachiche, 2012**).

---

**Préparation de la plaque**

Une ligne de dépôt des extraits est tracée à environ 1cm du bord inférieur de la plaque. Puis les échantillons en solution sont déposés sous forme de trait sur la ligne de dépôt à l'aide d'un capillaire. Ils sont espacés de 1cm. Les dépôts sont séchés immédiatement puis vérifiés sous UV pour s'assurer que la quantité déposée est bien suffisante (**Figure N° 22**).

➤ **Saturation de la cuve**

Le système de solvants est versé dans la cuve 15 minutes avant l'élution. Ceci a pour effet de saturer l'atmosphère de la cuve.

➤ **Développement du chromatogramme**

La plaque est placée en position presque verticale dans la cuve contenant le solvant de chromatographie, puis la cuve est fermée et le solvant migre par capillarité vers le haut le long de la plaque. Lorsque le front de solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et séchée à l'aide d'un séchoir.

➤ **Révélation**

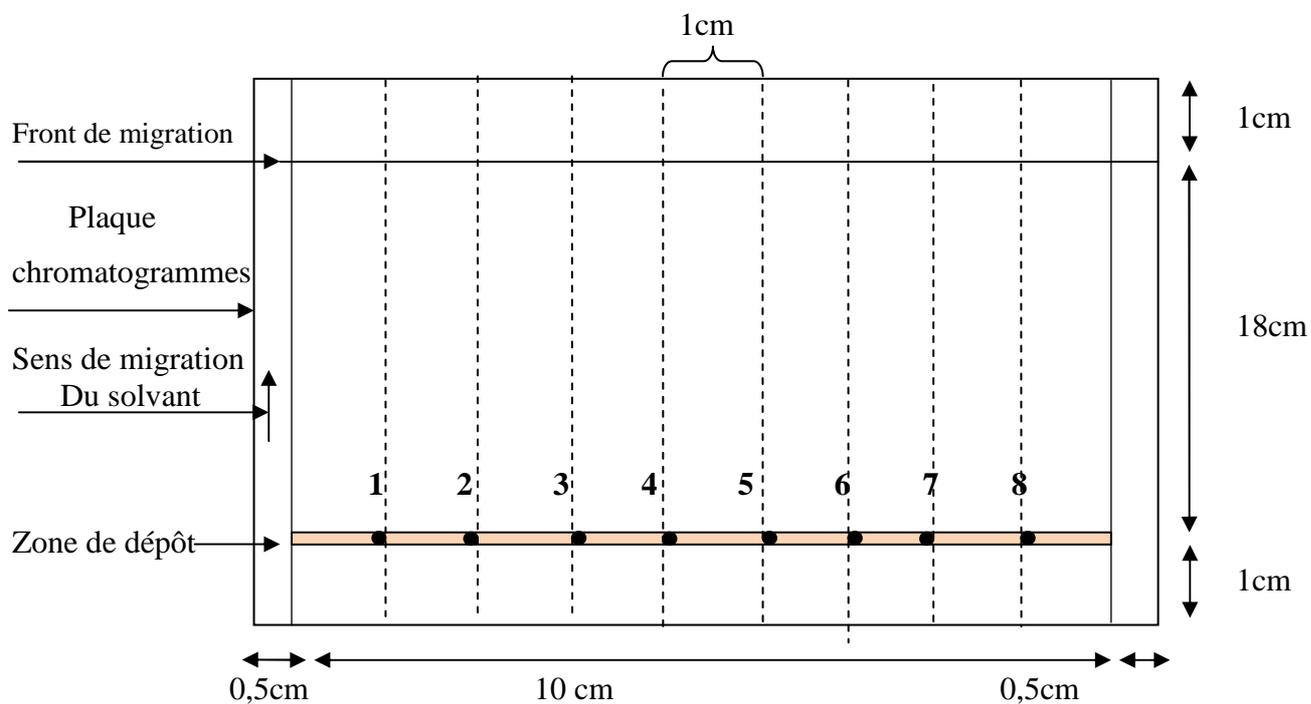
La plaque est d'abord observée sous lumière UV aux longueurs d'onde 254nm et 365nm. Les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres.

Les chromatogrammes sont révélés par pulvérisation de la plaque à la vanilline sulfurique ( $H_2SO_4$ ), la ninhydrine, et les cristaux d'iode (les molécules bioactives se colorent en brun).

**Tableau N°12.**

**Tableau N°12 :** Représente la Préparation des révélateurs chimiques de la chromatographie sur couche mince.

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



**Figure N° 22 :** Schéma du développement des fractions sur la plaque de CCM.

### III.7.3. Bioautographie des molécules bioactives

L'activité de chaque spot obtenu après migration est appréciée par un test antibactérien des portions de plaque de CCM. Le mode opératoire est le même que celui de la technique de diffusion sur gélose mais au lieu d'employer des disques de 6mm imprégnés de l'extrait, on utilise directement les portions de plaque de CCM (**Andriambololona, 2010**).

Les chromatogrammes sont alors déposés délicatement à la surface de la gélose Mueller Hinton préalablement ensemencé avec les bactéries –testes. Après pré-diffusion 2 heures à 4°C, et les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24 heures. Les zones d'inhibitions ont été notées après 24 heures d'incubation (**Kitouni, 2007**).

### III.7.4. Chromatographie phase gazeuse (CPG)

Identification des métabolites secondaires a été réalisée par une analyse par CPG en utilisant la méthode de **Khalvati et al.** Avec quelques modifications. Vingt ml de l'extrait brut exempt de cellules a été mélangée avec une combinaison d'acétate d'éthyle / méthanol (1: 1) dans une ampoule à décanter et agité énergiquement par secousses pendant 30 min et laissé au repos sans perturbation pendant 15 minutes.

La phase organique a été recueillie dans un bêcher en verre et on concentre à 1 ml. Une norme (pur) pour les combinaisons d'antibiotiques a été injectée dans le CPG pour régler ses profils de surface de pic et de temps de rétention équivalentes des antibiotiques individuels. Par la suite, 0,1 ul a été injecté en série à CPG 6890 (Hewlett Packard) en utilisant colonne SE 30 avec spécification (0,25 mm de colonne ×30 m, la porteuse de l'azote, de débit cinétiquement 22 mL / min, injection en température 220 ° C, l'accélération et le réflecteur en température 10 ° C / min, colonne en température initiale 50 ° C, la tenue Time-2 min). Le pic des antibiotiques standards ont été comparées à celles des échantillons d'essai (**Davies et al., 2015**).

*Résultat*  
*Et*  
*Interprétation*

## IV.1. Résultats de la revivification des souches d'actinomycètes représentatives

Au bout du 2<sup>ème</sup> jour d'incubation à 28°C les actinomycètes apparaissent, et se développent lentement. Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique très caractéristique. Elles apparaissent sèches, ronde, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose. Certains d'entre eux présentent seulement un mycélium de substrat.

## IV.2. Etude morphologique

### IV.2.1. Macromorphologie et caractères cultureux

Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des 8 souches sont résumés dans le (Tableau N° 13) (Figure N° 23).

**Tableau N° 13** : Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives retenues.

Code des souches	Milieu de culture	Couleur du M.A	Couleur du M.S	Pigments diffusibles
A6	GLM	Beige, blanc	Beige	Beige
A14	GLM	Blanc, Beige	Marron	Beige, Marron
A16	GLM	Blanc, Marron	Beige	Marron
A18	GLM	Beige, Gris	Marron	Beige, Jaune
A19	Bennett	Blanc, Gris Beige	Beige	Beige,
A20	Bennett	Noir, Marron, Gris	Marron, Noir, Brun	Brun, Noir
A26	Bennett	Blanc, Beige	Beige	Beige
A32	Bennett	Marron, Beige	Beige, Marron clair	Beige

(MA) : Mycélium aérien, (MS) : Mycélium de substrat

Après ensemencement sur les deux milieux GLM et Bennett, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28°C. Au 14<sup>ème</sup> jour la

majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes tailles et de couleurs de mycélium aérien (blanc, beige, brun, marron, noir, gris).

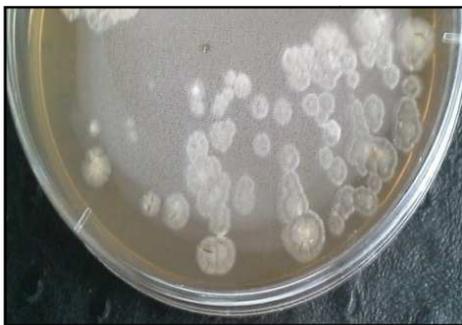
L'observation de l'envers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être (marron, beige, blanc, noir, brun, gris).

Les souches **A16**, **A14**, **A6** apparaissent sous forme des colonies circulaires poudreuse, convexes, bossues, à bords ondulés et irréguliers, de taille moyenne de 4 à 7mm, et adhèrent fermement au milieu de culture, elles sont difficiles à mettre en suspension.

Les souches **A18**, **A20** présentent des colonies à bords ondulés et irrégulières, opaques, adhèrent au milieu de culture.

Les souches **A26** présentent des colonies circulaires, à bords régulières, clair, de taille moyenne de 1 à 4 mm adhèrent au milieu de culture.

Les souches **A19** apparaissent sous formes des colonies, à bords ondulés et irrégulières adhèrent au milieu de culture.



**A14**



**A20**



**A18**



**A19**



A16



A26

**Figure N°23 :** Aspect du mycélium de substrat et du mycélium aérien sur les deux milieux des souches A14, A20, A18, A19, A16, A26.

## IV.2.2. Micromorphologie

### IV.2.2.1. Observation au faible grossissement

Après 7 jours d'incubation, déposées des lamelles sur une lame, puis observées au microscope optique (G×40). **Figure N° 24.**

Il apparaît que toutes les souches développent un mycélium de substrat, de taille moyenne, peu ramifiées, fragmenté pour les souches : A6, A14, A18, A19, A20 de à l'exception A26, A32 ce mycélium se présente sous forme de long filament ramifiés, non septé, non spores.



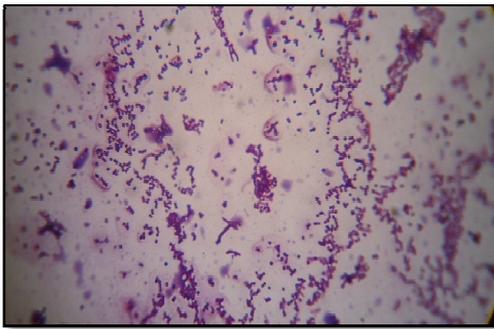
A18



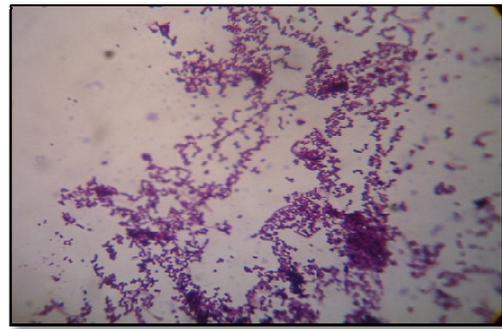
A6

**Figure N° 24 :** Observation des souches d'actinomycètes (Gx 40).

**IV.2.2.2. Résultat de la coloration de Gram :**



**A19**

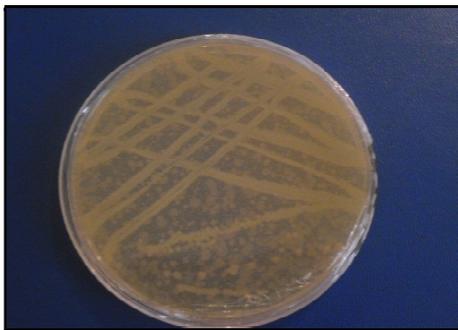


**A16**

**Figure N° 25 :** Observation des souches d'actinomycètes (Gx 100) après coloration de Gram.

**IV.3. Résultat de confirmation de l'identité et de la pureté des souches indicatrices**

**IV.3.1. L'aspect macroscopique**



*E. coli*



*B. subtilis*



*L. monocytogenes*



*S. aureus*

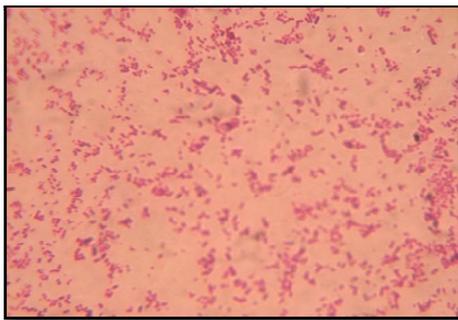


*P. aeruginosa*

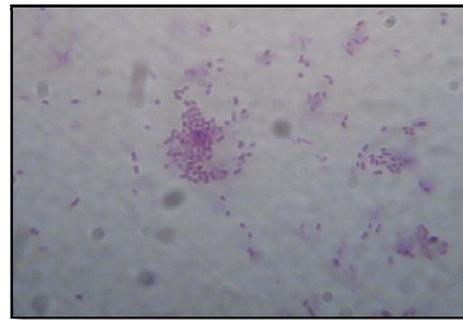
Figure N°26 : L'examen macroscopique de bactéries testées

#### IV. 3.2. Coloration de Gram

Les résultats sont résumés dans les photos ci-dessous.



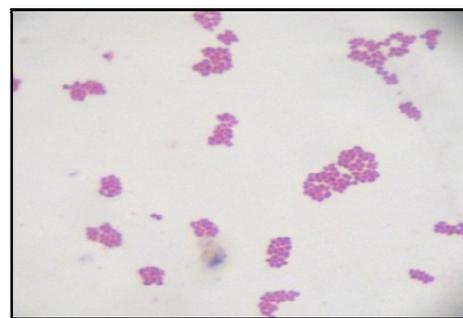
*E. coli* (Gram-)



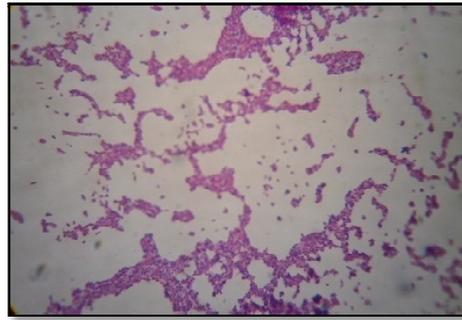
*B. subtilis* (Gram +)



*P. aeruginosa* (Gram -)



*S. aureus* (Gram+)



*L. monocytogenes*

**Figure N° 27** : Coloration de Gram de bactéries testées (Gx100).

### IV.3.3. Résultats du test de catalase

**Le tableau N°14** : illustre les résultats du test catalase des souches bactériennes testés.

**Tableau N° 14** : Résultat de test catalase.

Souche	Catalase
<i>E. coli</i>	+
<i>P. aeruginosa</i>	+
<i>S. aureus</i>	+
<i>B. subtilis</i>	+
<i>L. monocytogenes</i>	+



*S. aureus*

**Figure N° 28** : résultat du test catalase de *S. aureus*.

**IV.3.4.Résultat de l’antibiogramme**

Après 24 heures d’incubation. La sensibilité est mise en évidence par la présence d’une zone d’inhibition autour des disques d’antibiotiques. Les résultats sont montrés dans (**le tableau N° 15**).

**Tableau N°15** : Résultat du test de l’antibiogramme des bactéries inductrices.

Code Des antibiotiques	Gram+			Gram-	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>p. aeruginosa</i>
Erythromycine (E15)	11	11	0	0	14
Ampicilline (AM10)	11	19	0	0	12
Streptomycine (S10)	29	35	25	23	15
Tobramycine (TOB10)	15	24	13	14	11
Clindamycine (DA2)	10	17	11	0	25
Amikacine (AK30)	27	35	26	25	19
Kanamycine (K30)	22	33	20	21	18

Toutes les bactéries indicatrices utilisées dans cette étude ont présentées une résistance vis-à-vis de l’Erythromycine.

Les bactéries *B. subtilis*, *L. monocytogènes*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ont toutes présentés une résistance à l’Ampicilline avec des diamètres des zones d’inhibitions de 11, 0, 0, 12mm respectivement. Tandis que la souche *S. aureus a* présenté une sensibilité avec un diamètre de 19mm.

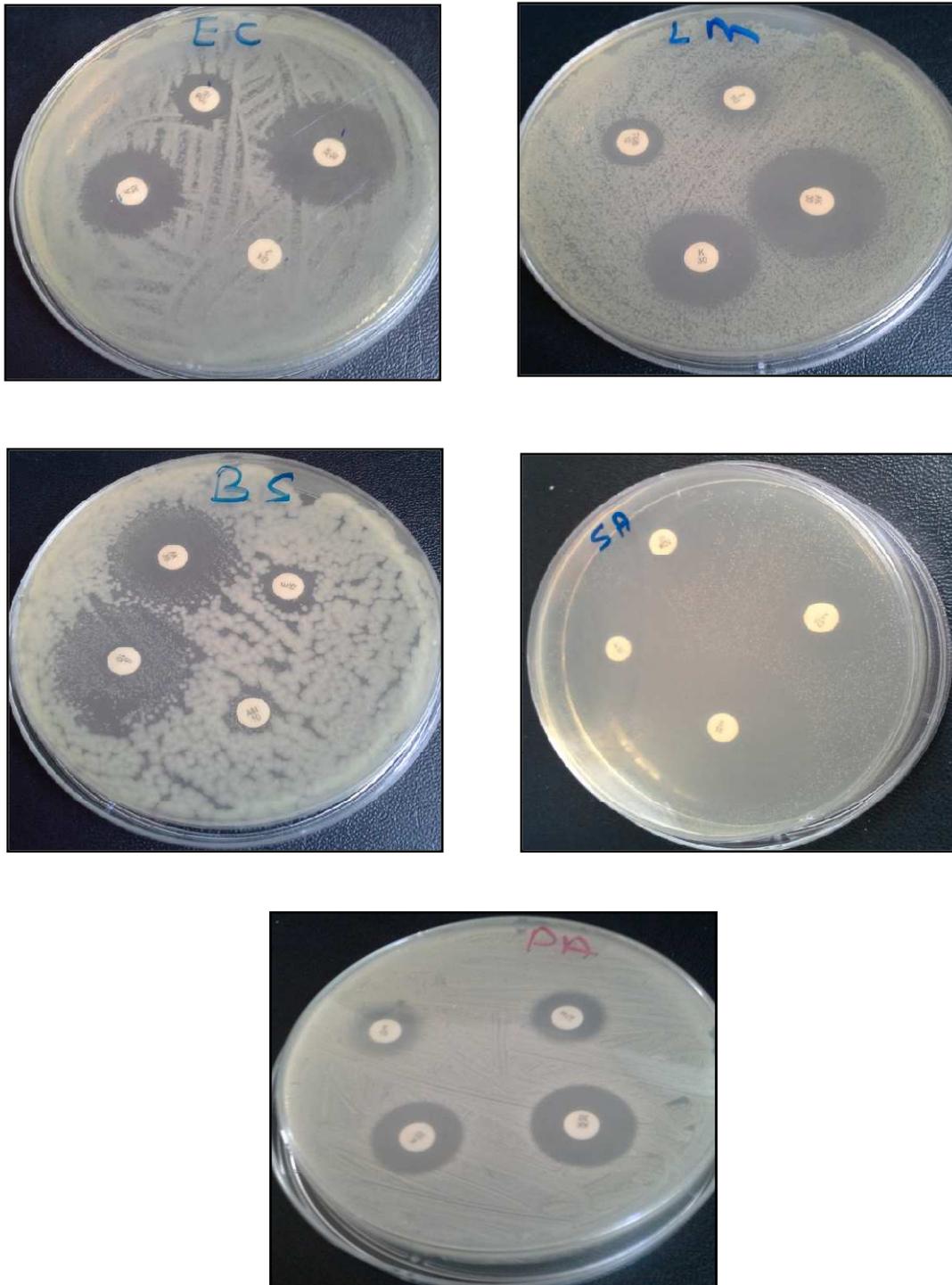
Toutes les souches utilisées ont présentés une sensibilité au Streptomycine.

Pour le Tobramicine, *L. monocytogenes*, *E. coli* et *P. aeruginosa* ont montrés une résistance avec des diamètres des zones d’inhibitions de 13, 14, 11mm respectivement. Cependant la souche *S. aureus a* présenté une sensibilité avec (24mm), alors que la souche *B. subtilis* a montrée un comportement intermédiaire avec une zone d’inhibition de 15mm.

*B. subtilis*, *L. monocytogènes*, *E. coli* ont présentés une résistance vis-à-vis Clindamycine (DA2) avec des diamètres des zones d’inhibition de 10, 11, 0 mm respectivement .Tandis que

les deux autres souches qui sont, *S. aureus*, *p. aeruginosa* ont montrés une sensibilité avec des diamètres de 17, 25 mm respectivement.

Toutes les bactéries utilisées ont présentés une sensibilité vers Amikacine et Kanamycine avec des zones d'inhibitions supérieures à 17 mm.



**Figure N° 29.** Résultat du test d'antibiogramme de bactéries indicatrices.

#### IV.4. Résultat de l'activité antibactérienne

Les résultats de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes (**A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26, A32**) isolées à partir de différents sols sont regroupés dans le **tableau 16**.

##### IV.4.1. Méthode des cylindres d'agar

##### IV.4.1.1. Test d'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est recherchée, par la technique des cylindres d'Agar, contre trois bactéries à Gram positif et deux bactéries à Gram négative (**Tableau 16**).

**Tableau N° 16** : Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar.

code	Gram+			Gram-	
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>p. aeruginosa</i>
A6	15	15	25	18	0
A14	30	0	24	0	0
A16	20	10	16	0	0
A18	22	20	25	0	0
A19	38	34	30	20	0
A20	27	28	20	0	0
A26	7	9	14	12	0
A32	7	8	9	11	0

Les résultats montrent que les 8 souches d'actinomycètes, sont actives contre au moins deux bactérie-test. Aucune souche parmi les 8 n'a présenté une activité contre *P. aeruginosa*,

Les souches **A6, A19, A26** et **A32** présentent un pouvoir inhibiteur contre *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* tandis que les souches **A16, A18, A20** ne montrent aucune activité contre *E. coli* Par contre la souche **A14** possède une activité seulement contre *B. subtilis* et *L. monocytogenes*.

Les souches **A16, A18** possède une activité contre *S. aureus* *L. monocytogenes*, *B. subtilis* avec des zones d'inhibition très importantes

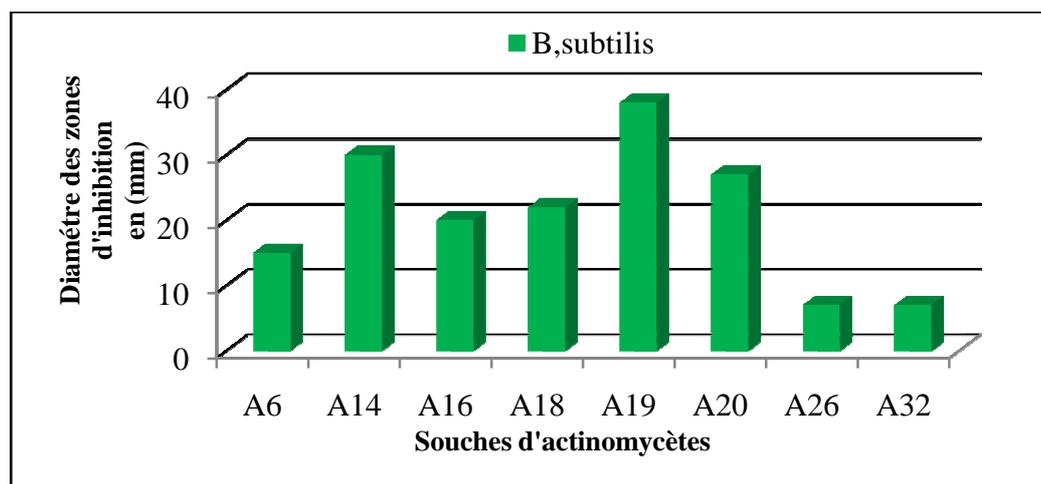
La souche **A19** possède une très forte activité contre *E. coli*, *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* avec des zones d'inhibition de 20,34, 30, 38 mm respectivement

La souche **A14** possède une forte activité contre *L. monocytogenes*, *B. subtilis* avec des zones d'inhibition de 24, 30 mm respectivement.

La souche **A20** possède une forte activité contre *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *B. subtilis* avec des zones d'inhibition de 28, 20, 27 mm respectivement.

La souche **A6** possède une activité contre, *B. subtilis*, *S. aureus*, *L. monocytogenes* *E. coli* avec des zones d'inhibition de 15, 15, 25, 18 mm respectivement.

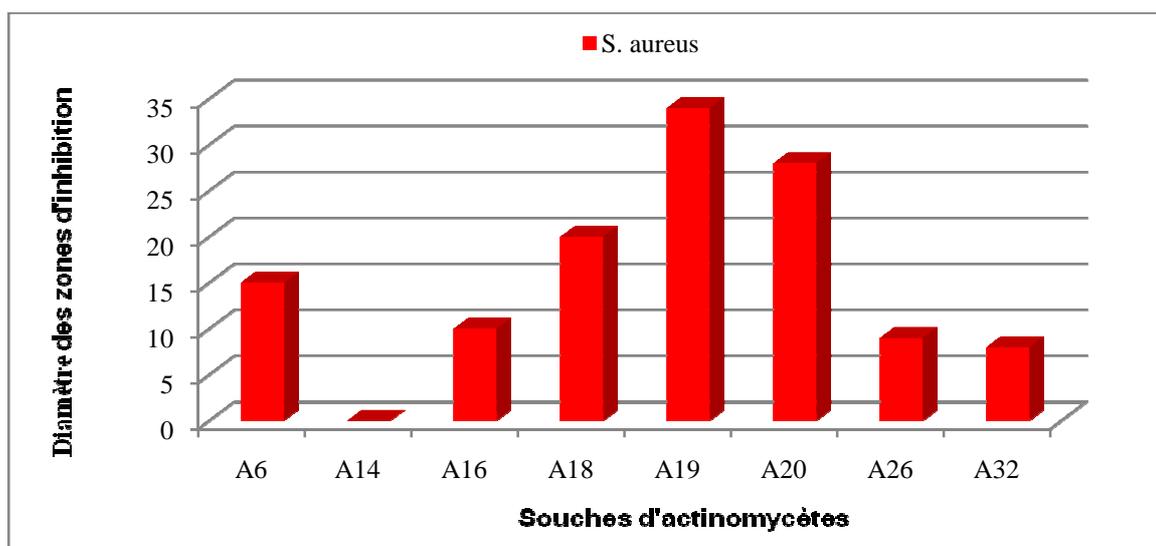
- **Inhibition de *Bacillus subtilis* (figure N°30)**



**Figure N° 30 :** Inhibition de *Bacillus subtilis* par nos isolats d'actinomycètes.

*Bacillus subtilis* était inhibée par les souches 8 testées. La plus grande zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche **A19** avec un diamètre de 38 mm. Les souches **A14** et **A20** ont données des zones d'inhibition d'un diamètre supérieur de 25 mm. Tandis que les souches **A6**, **A16** et **A18** ont données des zones allant de 15 à 22 mm. La valeur la plus faible a été obtenue par la souche **A26** et **A32** (7mm).

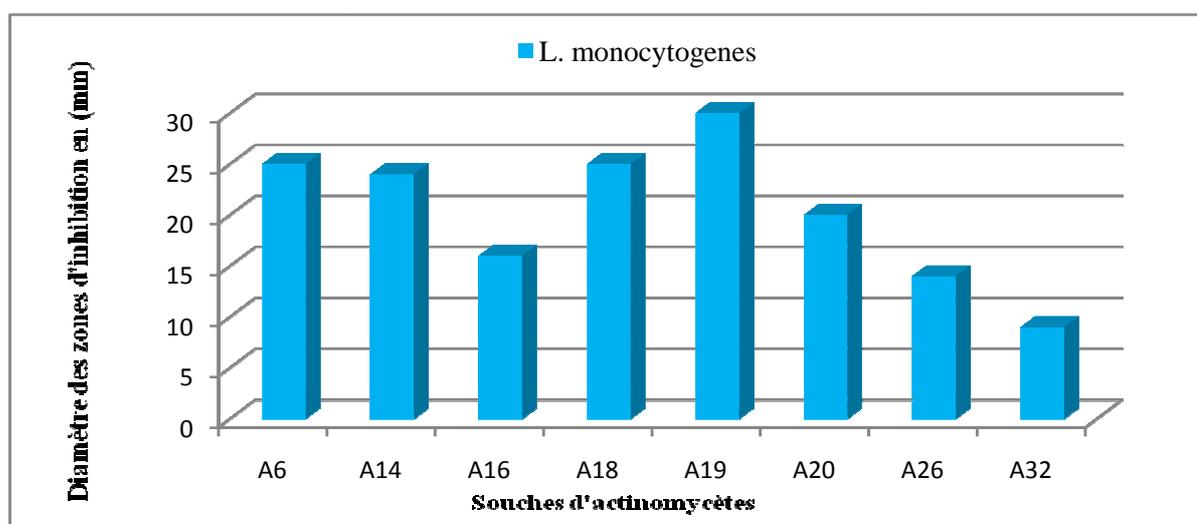
- Inhibition de *S. aureus* (figure N°31)



**Figure N°31 :** Résultat de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre *S. aureus*.

*S. aureus* a été inhibée par 7 souches parmi les 8 testées. La plus grande zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche **A19** avec un diamètre de 34 mm. Les souches **A18**, **A20** ont données des zones d'inhibition d'un diamètre de 20 et 28mm respectivement. Alors que toutes les autres souches **A6**, **A16**, **A26**, **A32** ont données des zones allant de 8 à 15mm.

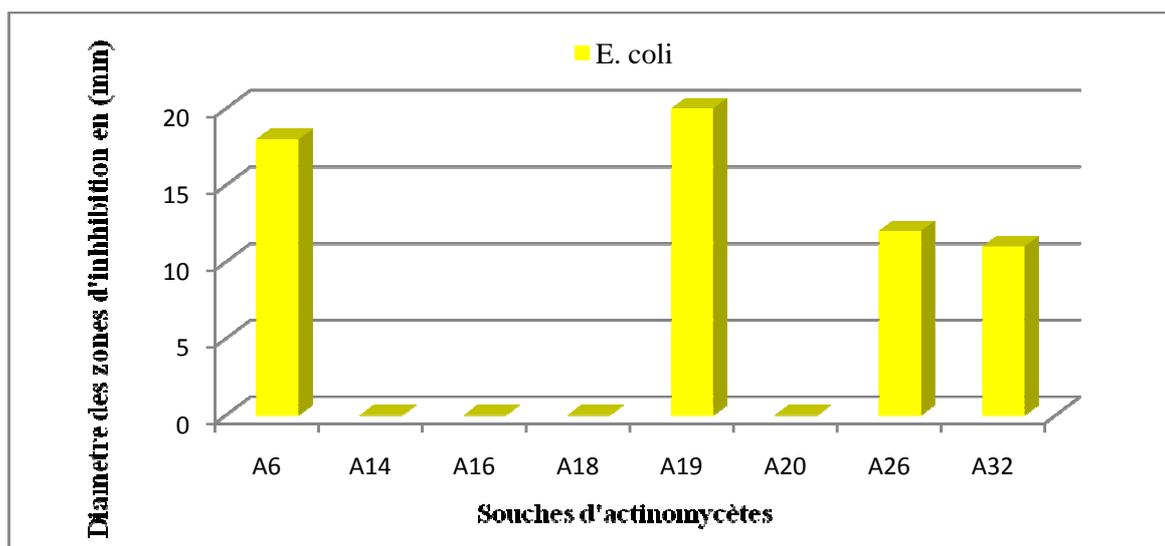
- Inhibition de *L. monocytogenes* (figure N°32)



**Figure N°32 :** Résultat de l'activité antagoniste des souches d'actinomycètes contre *L. monocytogenes*.

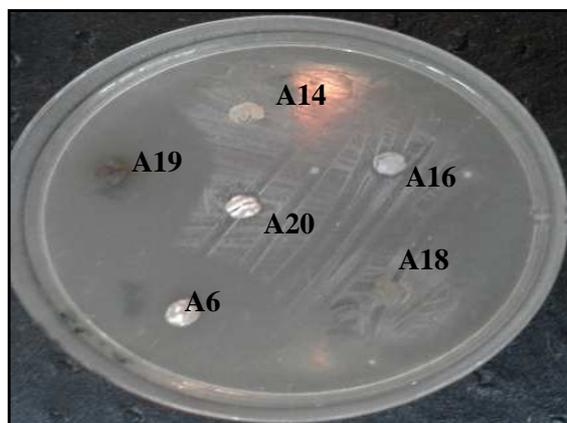
*L. monocytogenes* a été inhibée par les 8 souches testées. La plus grande zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche **A19** avec un diamètre de 30 mm. Les souches **A6, A14, A18, A20** ont données des zones d'inhibition d'un diamètre supérieur de 20 mm. Alors que les autres souches **A16, A26, A32** ont données des zones allant de 9 à 16mm.

- **Inhibition d'*E.coli* (figure N°33)**

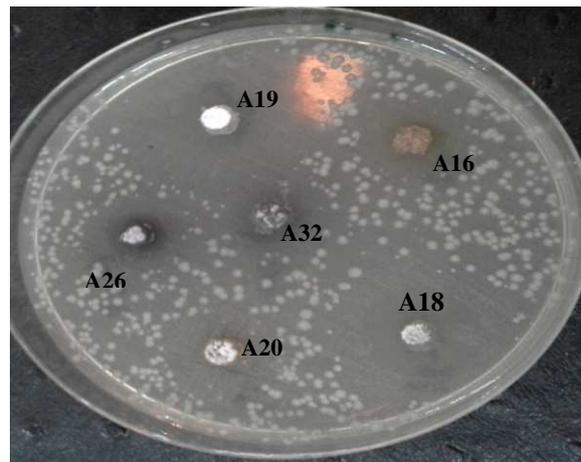


**Figure N°33** : Résultat de l'activité antibactérienne de souches d'actinomycètes contre *E. coli*.

*E. coli* à été inhibée par 4 souches parmi les 8 testées. La plus grande zone d'inhibition a été observée aux tours de cylindre d'agar de la souche **A19, A6** avec un diamètre de 20 et 18 mm respectivement. Les souches **A26, A32**, ont données des zones d'inhibition 12, 11mm respectivement. Alors que les autres souches ont ne montrent aucune activité antibactérienne.



**Figure N°34** Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre *E. coli* par la méthode des cylindres d'agar.



**Figure N°35.** Activité antibactérienne des souches d'actinomycètes contre *L. monocytogenes* par la méthode des cylindres d'agar.

## IV.5. Production et extraction de métabolites secondaires

### IV.5.1. Résultat de la fermentation sur milieu solide

Les 8 souches d'Actinomycètes sont cultivées par fermentation sur le milieu AF solide (voir composition en annexe) pour la production de métabolites secondaires pendant une période d'incubation de 7 à 14 jours à 28°C (**Figure N° 36**).

Les résultats de l'étude macromorphologique et caractères cultureux de ces 8 souches d'actinomycètes dans le milieu AF sont résumés dans le (**tableau N° 17**) et (**Figure N°36**).

**Tableau N° 17 :** Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux des souches actives dans le milieu AF.

Code des souches	Milieu de culture		
	AF (Actinomycètes Fermentation)		
	Couleur du M.A	Couleur du M.S	Pigments diffusibles
<b>A6</b>	Brun, Marron, Blanc	Beige foncé	Marron, Beige
<b>A14</b>	Jaune Foncé, Beige	Beige	Beige foncé
<b>A16</b>	Marron Foncé, Beige	Marron foncé	Marron, Beige
<b>A18</b>	Blanc	Jaune foncé	Beige
<b>A19</b>	Brun, Noir, Marron	Marron	Marron foncé
<b>A20</b>	Gris, Blanc, Marron	Jaune foncé	Beige foncé
<b>A26</b>	Beige, Marron	Marron foncé	Marron foncé
<b>A32</b>	Gris, Blanc	Marron	Marron foncé

Après ensemencement sur milieu AF solide, les colonies des souches d'actinomycètes actives apparaissent durant deux jours d'incubation à 28°C. Au 14<sup>ème</sup> jour la majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes tailles et de couleurs de mycélium aérien (blanc, beige, jaune, marron, noir, gris, brun).

L'observation de l'envers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être (marron, beige, jaune, noir).

La souche **A6**, apparaissent sous forme de colonies circulaires, opaques au centre et de contour blanc, convexes, à bords irréguliers, de taille moyenne de 1à 6mm, et adhérent fermement au milieu de culture.

Les souches **A14**, **A16**, **A19** et **A26** présentent des colonies à bords ondulés et irrégulières.

La souche **A32** apparaît sous forme de colonies circulaires opaques à bords réguliers de petite taille de 1 à 4 mm.



A16



A18



A6



A20



A32



A19



A26



A14

Figure N° 36 : Cultures d'Actinomycètes sur milieu AF solide.

**IV.5.2. Résultat d'extraction à partir du milieu solide**

Les métabolites secondaires produits par les souches d'Actinomycètes, lors de la fermentation pendant une incubation de 7 à 14 jours sur milieu AF solide, ont été récupérés avec le solvant organique. Nous avons utilisé comme solvant d'extraction le méthanol afin d'extraire la quasi-totalité des métabolites secondaires contenus dans le milieu de culture. Pour chaque culture, en utilisant 25ml méthanol, après filtration, centrifugation et évaporation à 40°C, 92 à 183 mg d'extraits sont obtenus pour chacune des souches d'actinomycètes. Les extraits obtenus (8 extraits) sont de couleur marron foncé, jaune claire et beige (**Tableau N°18**) et (**Figure N°37**).

**Tableau N°18** : Les poids des extraits des 8 souches d'actinomycètes.

Extrait	A6	A14	A16	A18	A19	A20	A26	A32
Poids (mg)	160,3	127,5	183,7	92	96,2	101,4	161,6	161,3



**Figure N° 37.** Les 8 extraits des 8 souches d'actinomycètes.

**IV.5.3. Activité antibactérienne des extraits méthanoliques**

Après 24 heures d’incubation, les observations montrent que les 8 extraits sont actifs sur les 4 germes testés. Cette activité est mise en évidence par la présence d’une zone d’inhibition autour des disques imbibés d’extrait avec 25 µl à une concentration de 50mg/ml. Les résultats des tests antibiogrammes des extraits sont montrés dans le (**Tableau N° 19**).

**Tableau N° 19 :** Diamètre d’inhibition (mm) des extraits sur les souches testées.

Souches Extraits	Diamètre de la zone d’inhibition en mm			
	<i>B. subtilis</i>	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E.coli</i>
<b>A6</b>	7	15	14	11
<b>A14</b>	12	12	12	14
<b>A16</b>	8	12	10	9
<b>A18</b>	20	12	10	9
<b>A19</b>	9	17	16	15
<b>A20</b>	15	15	8	14
<b>A26</b>	7	12	14	12
<b>A32</b>	7	8	9	13
<b>Témoin</b>	7	7	7	7

D’après les résultats obtenus, on constate que les 8 souches d’actinomycètes ont présenté une activité contre les 4 bactéries testées. La souche A18 a présenté la plus forte activité avec un diamètre de la zone d’inhibition de 20mm et ceci contre *B. subtilis*. Les autres souches **A14**, **A16**, **A19**, **A20** ont données des zones d’inhibition avec d’un diamètre de 12, 8, 9, 15 mm respectivement. Alors que la valeur la plus faible a été obtenue par les souches **A6**, **A26** et **A32** (7mm).

Contre *S. aureus* la souche A19 présente la zone d’inhibition la plus grande aux tours de disque avec un diamètre de 17mm. Toutes les autres souches ont données des zones allant de 8 à 15 mm.

Pour *L. monocytogenes* la souche A19 a aussi montrée la zone d'inhibition la plus grande avec un diamètre de l'ordre de 16mm. Toutes les autres souches ont données des zones allant de 9 à 14 mm, la valeur la plus faible a été obtenue par la souche A20 (8mm).

Contre *E.coli* la souche A19 a présenté la zone d'inhibition la plus grande avec un diamètre 15mm. Toutes les autres souches ont données des zones allant de 11 à 14 mm, la valeur la plus faible a été obtenue par la souche A16, A18 (9mm).



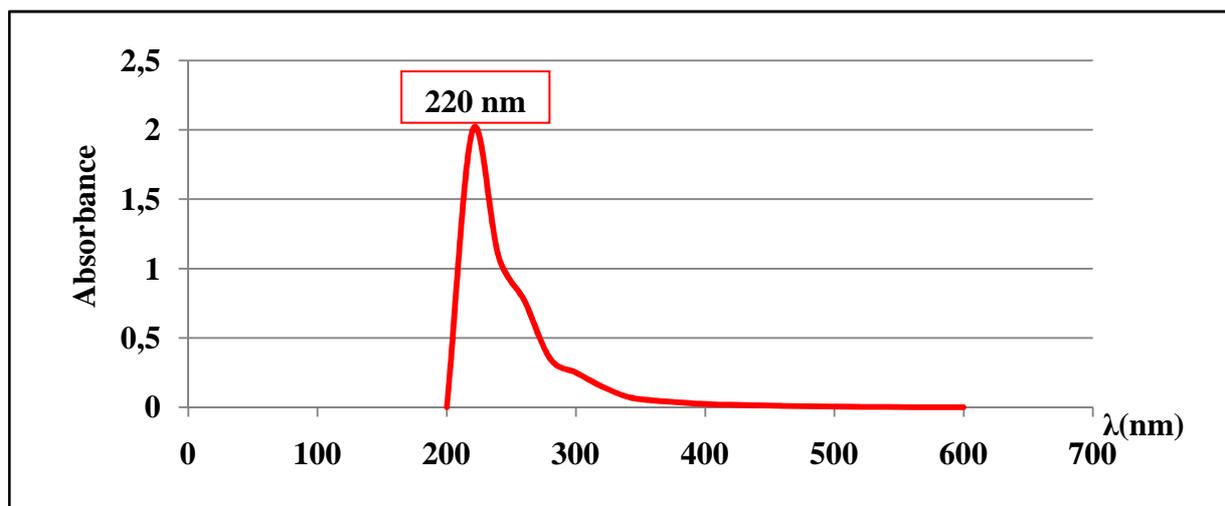
**Figure N°38** ; Les zones d'inhibition provoquées par l'extrait méthanolique des souches contre *E.coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*.

## IV.6. Caractérisation de l'extrait méthanolique actif

### IV.6.1. Résultats du spectre UV-Visible

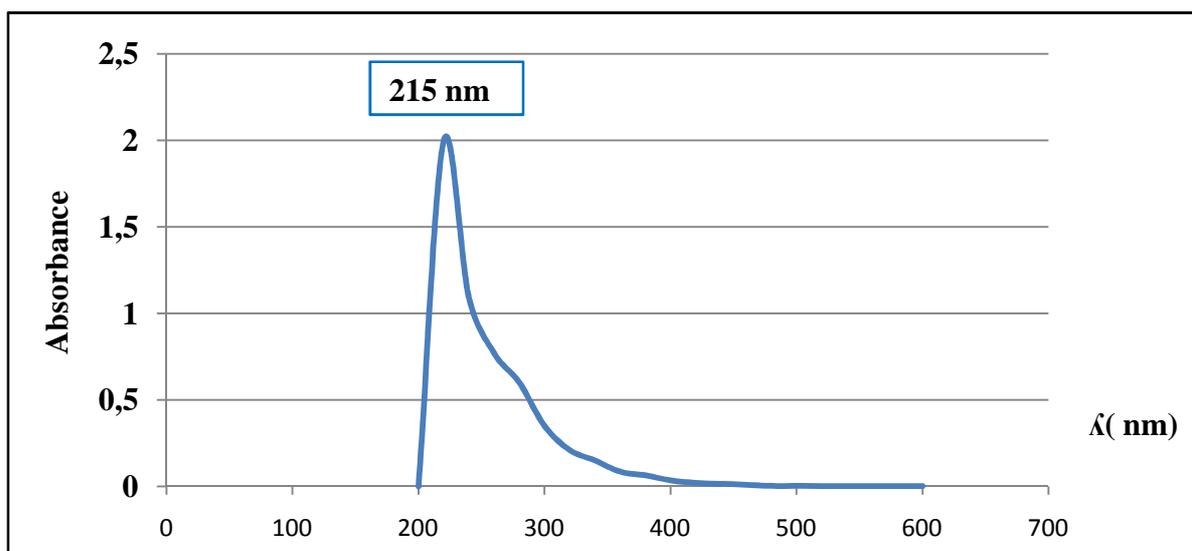
Le spectre UV-Visible des extraits méthanoliques brut des souches actives retenues a été réalisé afin de mettre en évidence la présence des double liaisons conjugués dans la structure chimique des antibactériens, autrement dit savoir si ces antibactériens sont de structure polyénique ou non polyénique. (Hamilton-Miller, 1973).

Le spectre UV-Visible de l'extrait méthanolique brut de la souche A6, présenté dans la **figure 39**, montre que le maximum d'absorption situé à une longueur d'onde de 220 nm. Deux absorptions ont été marquées également à 290 et 320nm.



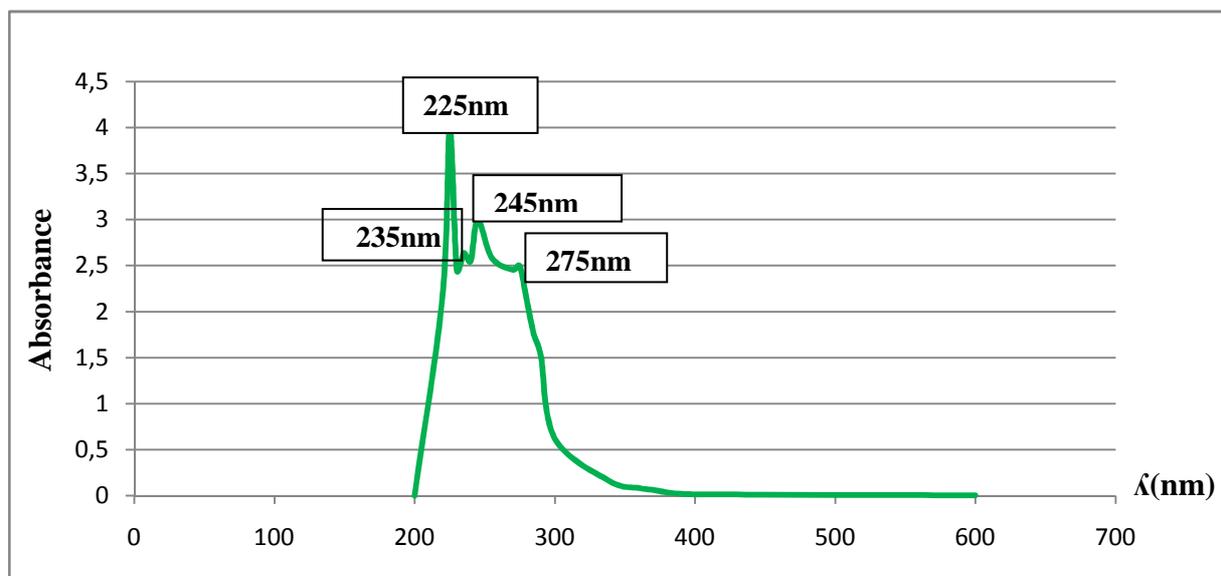
**Figure N° 39 :** Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A6**.

L'extrait de la souche A14 a présenté un pic correspond au maximum d'absorption à une longueur d'onde 215nm. La courbe présente aussi des absorptions aux longueurs d'onde de 280 et 350nm (**Figure 40**).



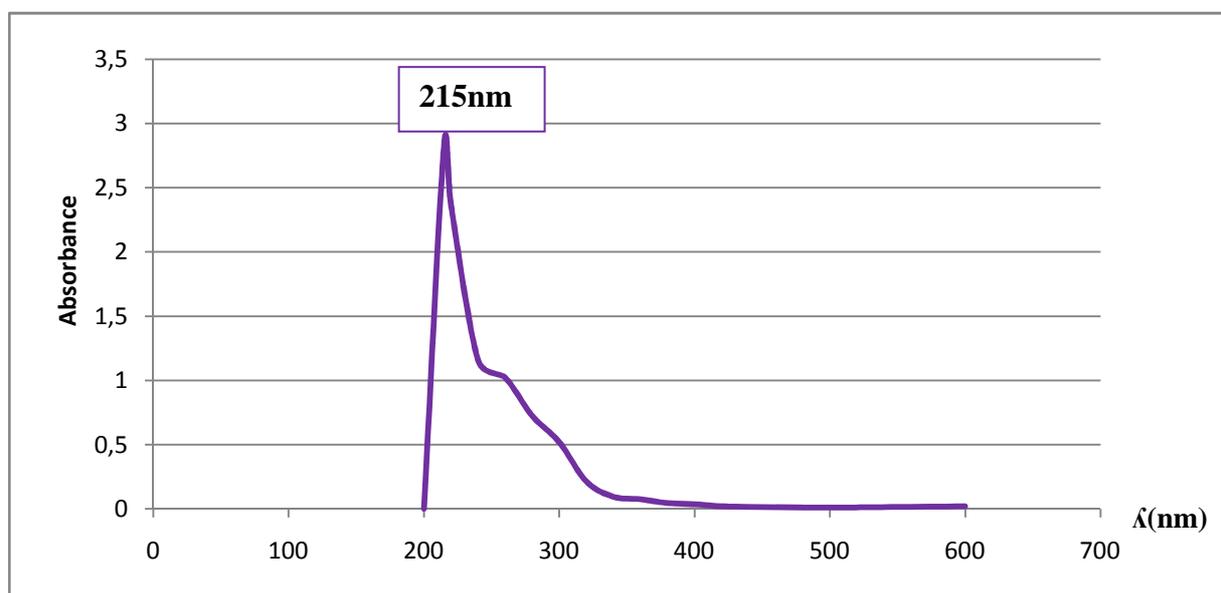
**Figure N° 40 :** Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A14**.

Le spectre UV-Visible de l'extrait brut méthanolique de la souche A16, présente dans la **figure 41**, montre la présence de quatre pics d'absorption aux longueurs d'onde de 225nm, 235 nm, 245nm et 275nm. Le maximum d'absorption est marqué à 225nm.



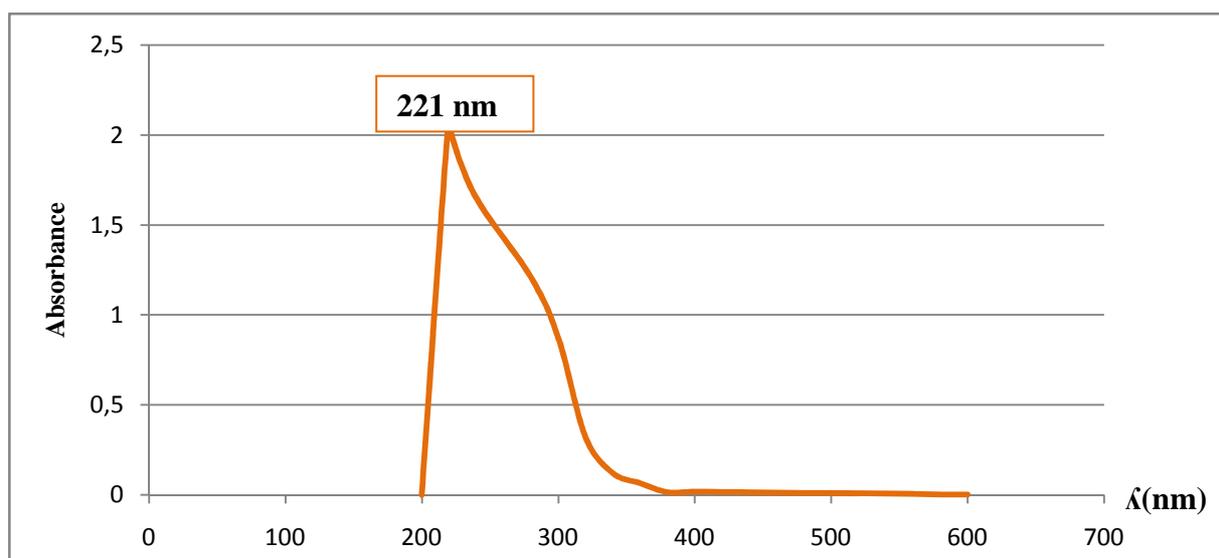
**Figure N° 41 :** Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A16**.

Le spectre UV-Visible de l'extrait méthanolique brut de la souche A18, présente dans la **figure 42**, montre la présence d'un seul pic avec un maximum d'absorption à une longueur d'onde 215nm. Avec une gamme d'absorbance entre 260 et 340 nm.



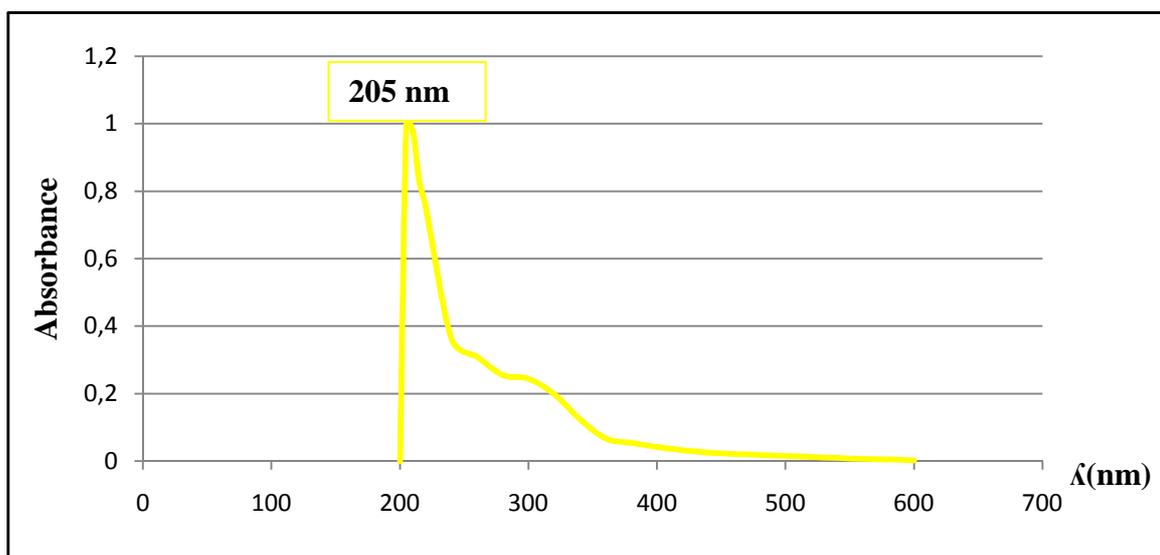
**Figure N° 42 :** Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A18**.

L'extrait méthanolique brut de la souche A19, présente dans la **figure 43**, montre la présence d'un seul pic avec un maximum d'absorbance à une longueur d'onde 221nm.



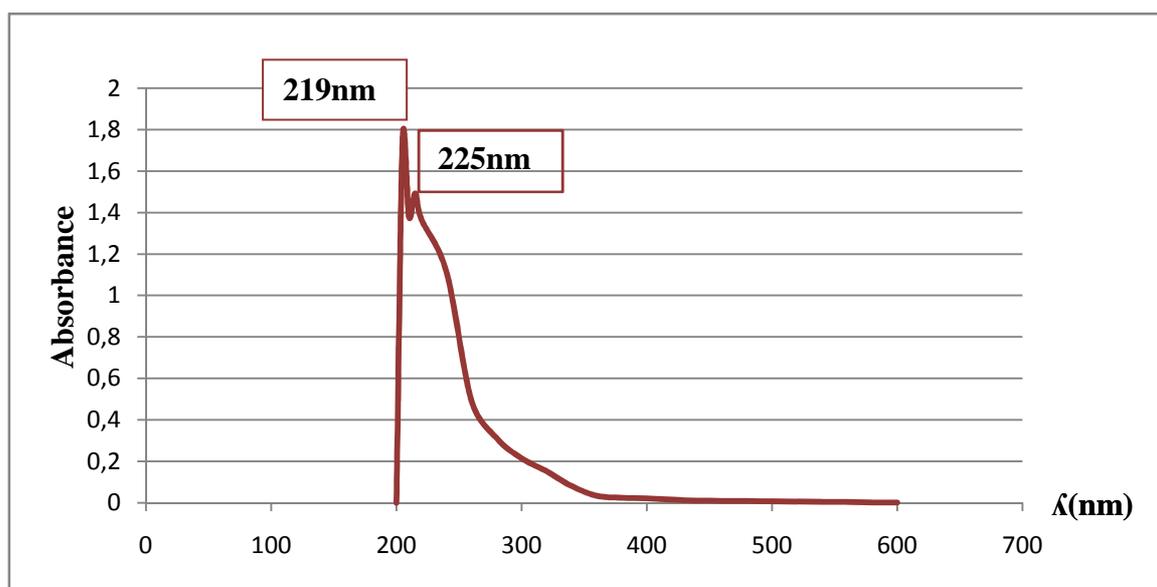
**Figure N° 43** : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A19**.

La **figure 44** représente le spectre UV-Visible de l'extrait méthanolique brut de la souche A20. Le maximum d'absorption est observé à une longueur d'onde de l'ordre de 205nm. On observe aussi une gamme d'absorbance entre 280 et 320nm.



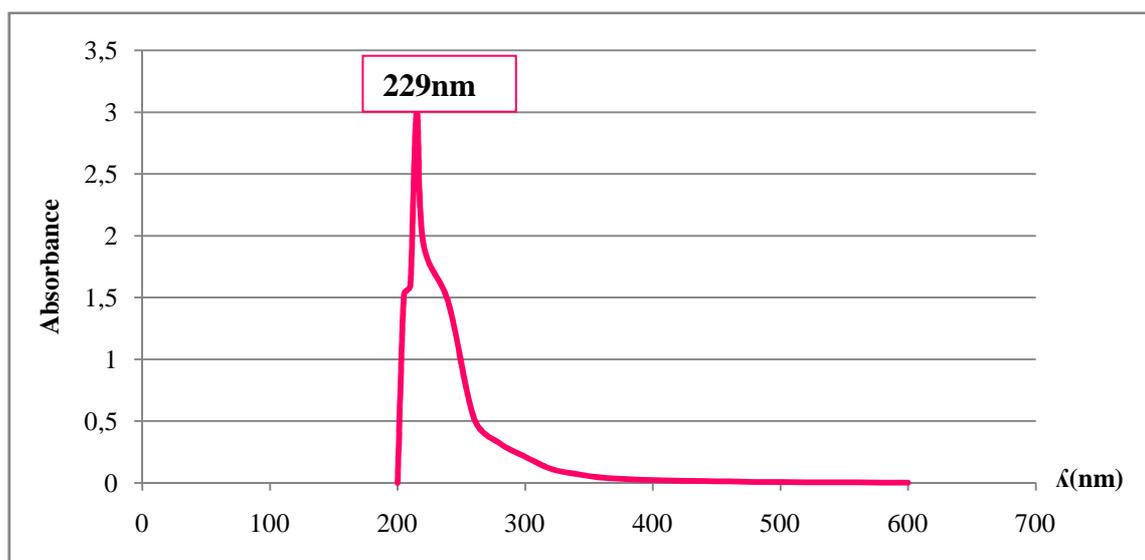
**Figure N° 44** : Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A20**.

Le spectre UV-Visible de la souche A26, présente dans la **figure 45**, montre la présence de deux pics avec un maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 219nm, 225 nm respectivement.



**Figure N° 45 :** Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A26**.

Le spectre UV-Visible de la souche A32, présente dans la **figure 46**, montre la présence d'un seul pic avec un maximum d'absorbance à une longueur d'onde de 229nm.



**Figure N° 46 :** Spectre UV-Visible de l'extrait actif de la souche **A32**.

**IV.6.2. Résultats de la chromatographie sur couche mince (CCM)**

Le tableau N°20 regroupe les rapports frontaux des composés séparés en utilisant différents systèmes de solvants.

**Tableau N°20.** Résultat de la CCM des 8 extraits méthanoliques des souches d'actinomycètes.

Les systèmes solvant	Rapports frontaux (Rf)							
	A6	A14	A16	A18	A19	A20	A26	A32
Toluène-acétone (6 :4)	0	0	0	0	0	0	0	0
Toluène- acide acétique (8 :2)	0	0	0	0	0	0	0	0
N-butanol-acide acétique eau (3 : 1 : 1)	0	0	0	0	0	0	0	0
Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4)	0	0,11 <sup>(1)</sup> 0,30 <sup>(1)</sup> 0,75 <sup>(1)</sup> 0,85 <sup>(2)</sup> 0,90 <sup>(1)</sup>	0,05 <sup>(1)</sup> 0,75 <sup>(1)</sup> 0,85 <sup>(2)</sup> 0,90 <sup>(1)</sup>	0,07 <sup>(1)</sup> 0,47 <sup>(1)</sup> 0,57 <sup>(1)</sup> 0,85 <sup>(2)</sup> 0,87 <sup>(1)</sup>	0,07 <sup>(2)</sup> 0,87 <sup>(2)</sup>	0	0,84 <sup>(2)</sup> 0,87 <sup>(2)</sup>	0
Toluène- méthanol (5 :5)	0	0	0	0	0	0	0	0
Déchlorométhane – méthanol (8,2)	0	0	0,27 <sup>(2)</sup>	0	0	0	0	0

<sup>(1)</sup> tache révélée a 254nm

<sup>(2)</sup> tache révélée a 365nm

Aucune séparation n'est obtenue sur les 8 extraits en utilisant les systèmes solvants composés de Toluène-acétone (6 :4), N-butanol-acide acétique-eau (3 :1 :1), Toluène- méthanol (5 :5) et Toluène- acide acétique (8 ; 2).

Le système solvant Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4), a permet une migration rapide des molécules biactives. Nous avons obtenus 18 taches bien distinguées sur la plaque CCM pour les extraits des isolats A14, A16, A18, A19 et A26.

Pour l'extrait brut de l'isolat **A14**, 5 taches sont observées dont **4** tache avec les  $R_f$  (0,11- 0,30- 0,75- 0,90) apparaît sous la lampe UV à 253 nm et une seule tache fluorescente détectée à 365 nm avec un  $R_f$  de 0,85.

Pour l'extrait brut de la souche **A16** nous avons marqué 4 taches. Les composés possédant les rapports frontaux (0,05- 0,75 et 0,90) sont détectés à 253 nm alors qu'un seul point ( $R_f = 0,85$ ) est observé à 365 nm.

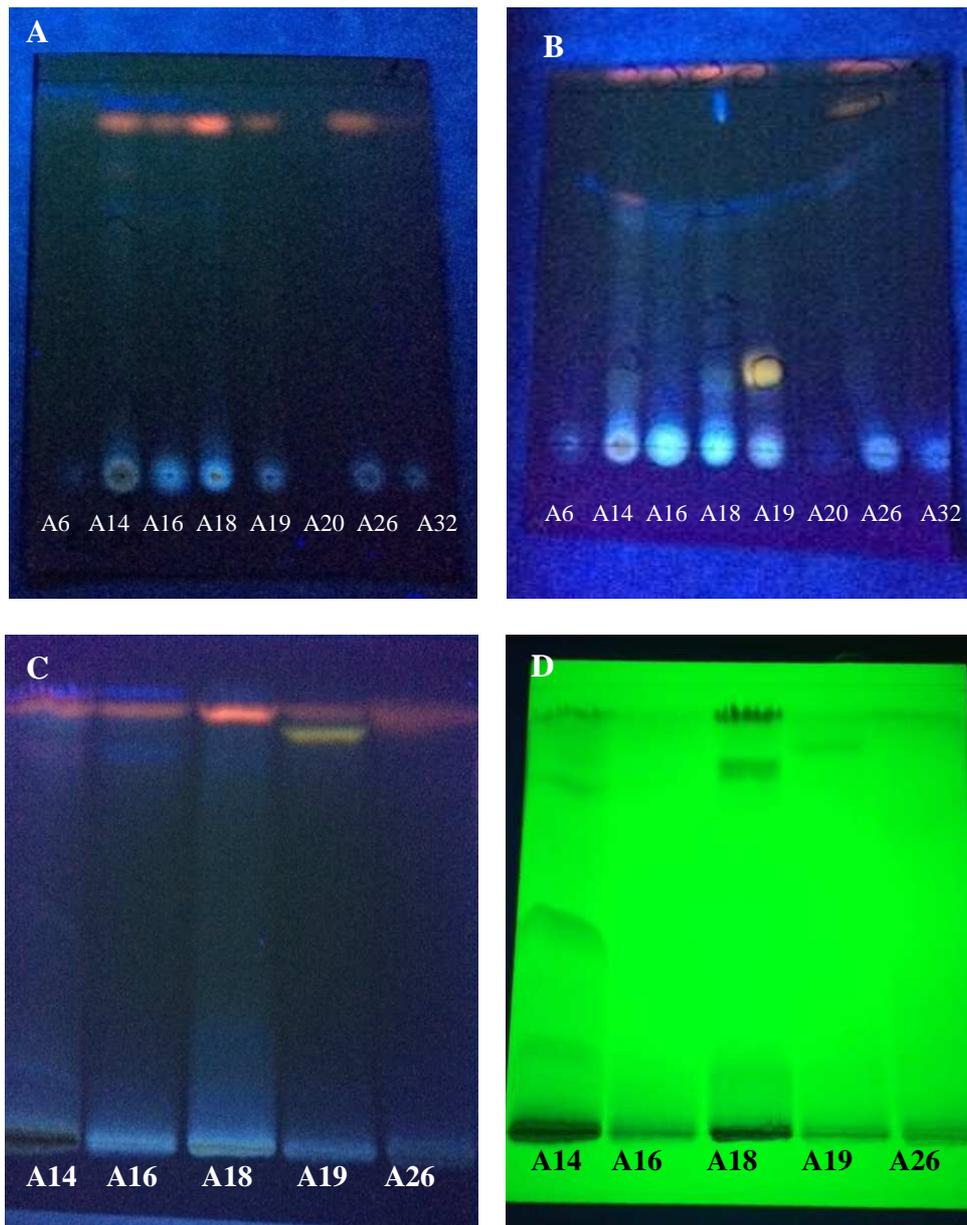
L'extrait brut de la souche **A18** présente 5 taches avec les  $R_f$  (0,07- 0,47- 0,57- 0,87) détectés à 253 nm et une tache avec  $R_f$  (0,85) à 365 nm.

Deux taches de l'extrait brut de la souche **A19** avec les  $R_f$  (0,07- 0,87) respectivement absorbant à 365 nm.

L'extrait brut de la souche **A26** a donné deux spots seulement avec un  $R_f$  (0,84- 0,87) observés sous une lumière à 365 nm.

Aucun système solvant n'a réussi dans la séparation des composés des extraits bruts des souches **A6**, **A20**, **A32**.

Pour le système solvant Dichlorométhane –méthanol (8,2) seulement l'extrait de la souche **A16** a donné une seule tache avec  $R_f$  (0,27) observée à 365 nm,



**Figure N°47.** Chromatogramme représentant les résultats des CCM des extraits bruts méthanoliques sous UV à 254(D) et 365(A, B, C) nm.

#### IV.6.3. Résultats de la bioautographie

Après 24 heures d'incubation à 37°C, des zones claires correspondant à des zones d'inhibition ont été observées autour des portions des plaques de CCM sur la culture de *S. aureus*. (Tableau N° 21) et (Figure N°48).

**Tableau N°21** : Diamètres et *Rf* des zones d'inhibition des fractions sur *S. aureus*.

Les taches	Diamètre du halo d'inhibition (mm)	Référence frontale de la bande active ( <i>Rf</i> )
A14	11	0,11
A14	12	0,30
A16	12	0,85
A18	11	0,47
A19	15	0,07
A26	10	0,87

Pour l'extrait brut de la souche A16, le composé actif a migré avec *Rf* de 0.85, ceci est manifesté par une zone d'inhibition de 12mm de diamètre.

L'extrait brut A18 a donné une zone d'inhibition de 11mm de diamètre autours du composé qui possède le *Rf*0,47.

La plus grande zone d'inhibition contre *S. aureus* a été observée sur l'extrait brut de la souche A19 au niveau du composé qui possède le *Rf* de 0,07 avec un diamètre de 15mm.

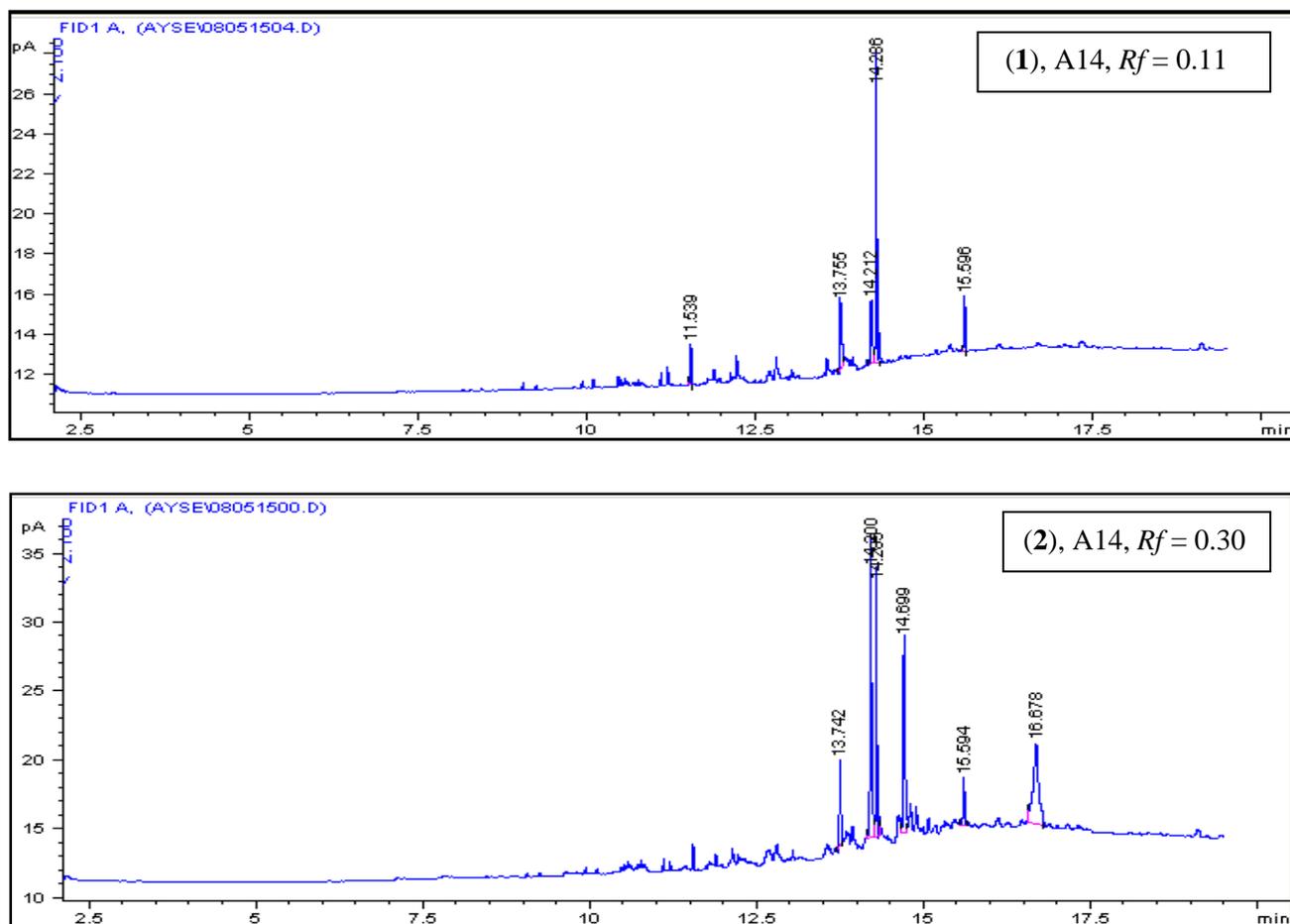
Pour l'extrait brut de la souche A26, le composé qui a migré avec le *Rf* de 0,87 montre une activité conte *S. aureus* avec une zone d'inhibition de 10 mm.



**Figure N °48** : Bioautographie de la plaque CCM des extraits des souches A14, A16, A26 contre *S. aureus*.

#### IV .6. 4. Résultats de la chromatographie phase gazeuse (CPG)

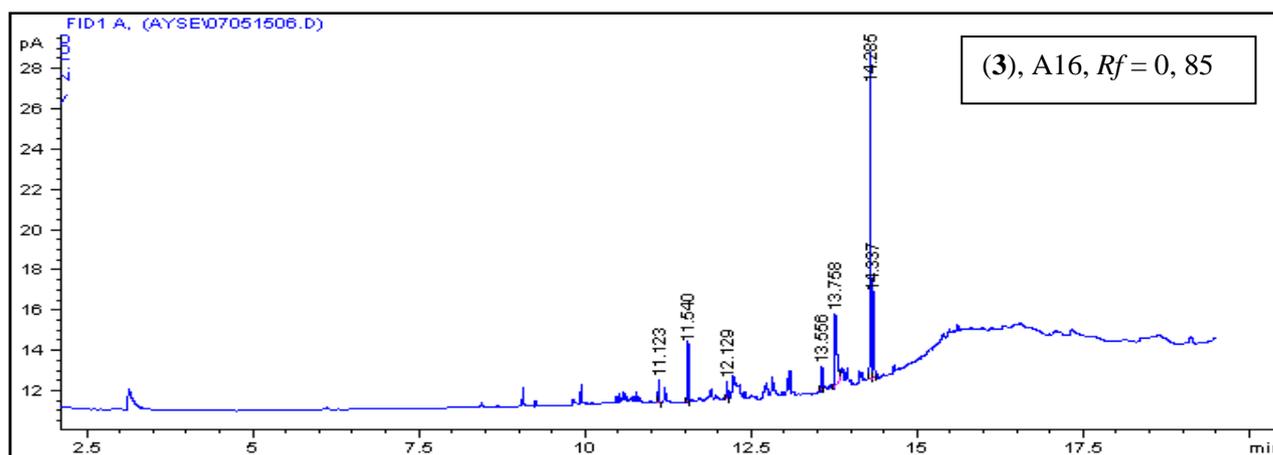
Les composés actifs qui ont donné une zone d'inhibition contre *S. aureus* dans le test de bio autographie ont subi caractérisation préliminaire en utilisant la CPG. Les résultats obtenus sont présentés dans les figures (49,50, 51, 52, 53).



**Figure N°49 :** Les graphes (1), (2), représentent les résultats de l'analyse par CPG des taches de l'extrait méthanolique de la souche A14.

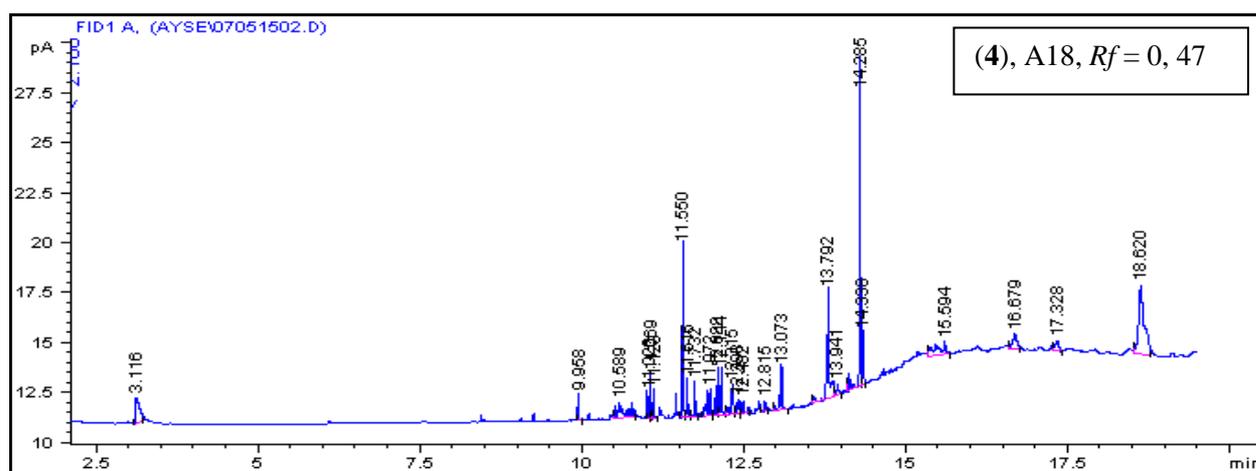
Le graphe (1) représente le spectre CPG de l'extrait méthanolique de la souche 'A14 de la tache qui possède le  $R_f$  (0,11). Ce graphe montre la présence de 5 Pics avec un temps de rétention de (11,539- 13,755- 14,212- 14,286- 15,596) min respectivement.

Le graphe (2), A14,  $R_f = 0.30$ , ce graphe représente le spectre CPG, on montre la présence de 6 pics avec un temps de rétention de (13,742- 14,2- 14,285- 14,699- 15,594- 16,678) min respectivement.



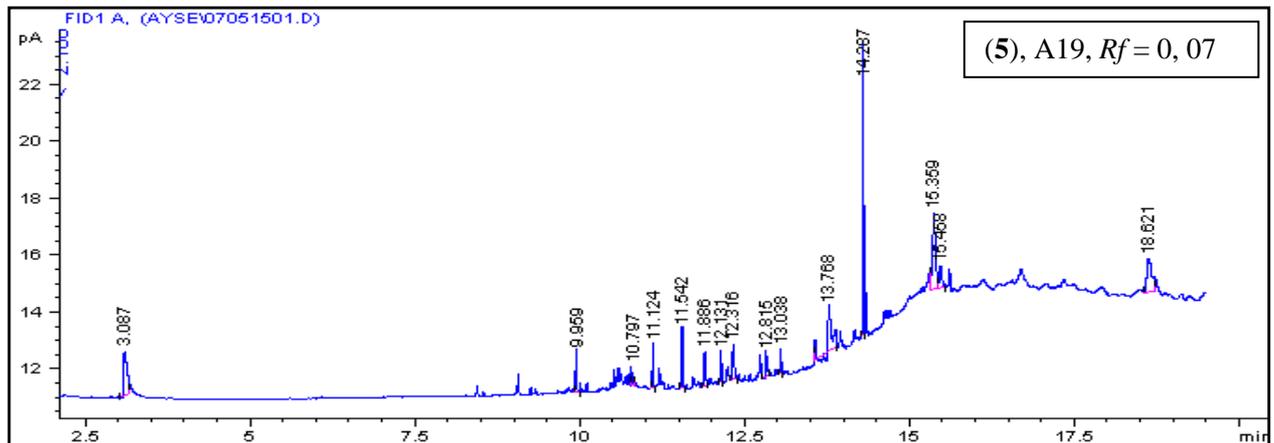
**Figure N°50 :** Le graphe (3) représente le résultat de l'analyse par CPG de taches actif de l'extrait méthanolique de la souche A16.

Le graphe (3), A16,  $R_f=0.85$ , ce graphe représente le spectre CPG, on montre la présence de 7 pics avec un temps de rétention de (11,123- 11,54- 12,129- 13,556- 13,758- 14,285- 14,337) min respectivement.



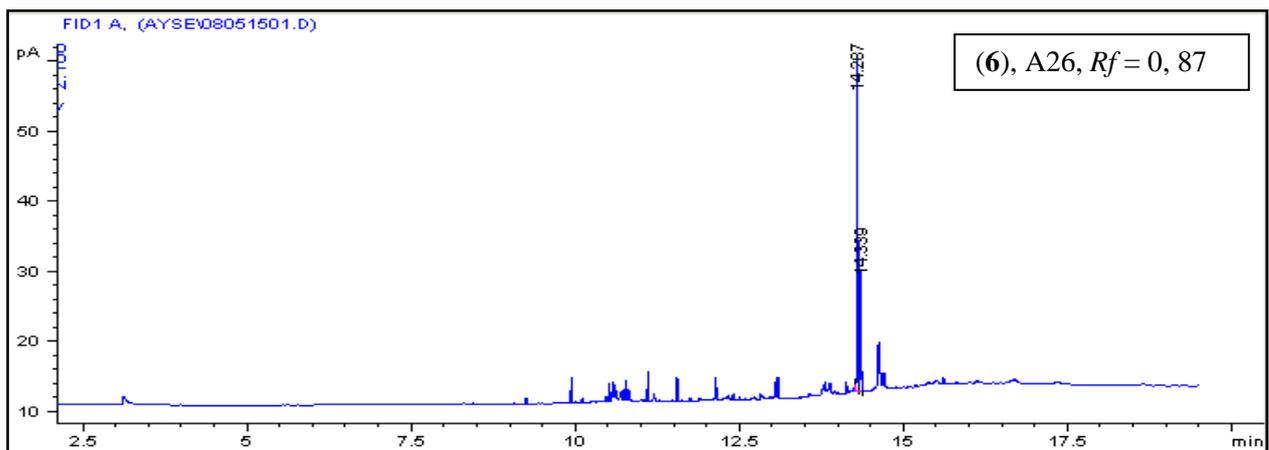
**Figure N°51 :** Les graphes (4) représentent le résultat de l'analyse par CPG de taches actif de l'extrait méthanolique de la souche A18.

Le graphe (4), A18,  $R_f=0.47$ , ce graphe représente le spectre CPG, on montre la présence de 23 pics avec un temps de rétention de (3,116- 9,958- 10,589- 11,026- 11,069- 11,123- 11,550- 11,616- 11,732- 11,972- 12,088- 12,144- 12,482- 12,815- 13,073- 13,792- 13,941- 14,285- 14,338- 15,594- 16,679- 17,328- 18,620 ) min respectivement.



**Figure N°52 :** Le graphe (5) représenté le résultat de l’analyse par CPG de tache de l’extrait méthanolique de la souche A19.

Le graphe (5), A19,  $R_f=0.07$ , ce graphe représente le spectre CPG, on montre la présence de 15 pics avec un temps de rétention de (3,087- 9,959- 10,797- 11,124- 11,542- 11, 886- 12, 131- 12,316- 12,815- 13,038- 13,768- 14,287- 15,359- 15,458- 18,621) min respectivement.



**Figure N°53 :** Le graphe (6), représente le résultat de l’analyse par CPG de tache de l’extrait méthanolique de la souche A26.

Le graphe (6), A26,  $R_f=0.87$ , ce graphe représente le spectre CPG, on montre la présence de 2 pics avec un temps de rétention de (14,287- 14,339) min respectivement.

## *Discussion*

## Discussion

Les bactéries de la famille des Actinomycètes retiennent particulièrement l'attention des chercheurs et semblent être d'excellentes candidates productrices de substances aux propriétés intéressantes.

Elles sont très largement distribuées dans la nature et principalement dans les sols de différentes natures

Les Actinomycètes en général, et plus particulièrement les *Streptomyces* ont une importance médicale et industrielle parce qu'ils synthétisent des antibiotiques de structures très diverses et en quantité abondante. En effet, plus de cinquante antibiotiques différents ont été détectés dans le genre de *Streptomyces*, y compris la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines (**Goodfellow et Williams, 1983**).

A ces antibiotiques dans le champ d'application s'étend non seulement aux divers domaines thérapeutique humaine et vétérinaire mais aussi à l'agriculture, s'ajoutent d'autres produits comme des enzymes et lorsque ces bactéries ont principalement pour habitat naturel le sol où elles jouent un rôle important dans la décomposition et la minéralisation des matières organiques (lignine, cellulose...), grâce à la production de nombreuses enzymes lytiques extra cellulaires comme par exemple les amylases, les xylanases, les lipases. Et des inhibiteurs d'enzymes dont certains manifestent des activités pharmacologiques soulignant encore l'intérêt de ces microorganismes (**Theilleux, 1993**).

Les souches d'actinomycètes servant d'objet de ce travail ont été isolées d'échantillons de sols arides de la région d'Ain Loarak, Sebkhah de Bougtob et 'El Bayard, dans des travaux antérieurs, identifiées physiologiquement et biochimiquement au genre *Streptomyces* (**Naimi, 2014**) et conservées.

Nos échantillons du sol sont caractérisés par :

1. Sol d'Ain Louarak : aride dur et dépourvue de végétation et présent un pH de 6,55.
2. Sol de Sebkhah : aride, de nature sableuse, dépourvue de végétation présentant un taux de salinité élevé, et présentant un pH de 8,53.
3. Sol d'Al Bayadh : aride de nature sableuse, dépourvue ou presque de végétation et présent un pH de 6,71.

Les souches d'actinomycètes utilisées dans cette étude (**A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26, A32**) appartiennent au genre *Streptomyces* (**Naimi, 2014**). Les 8 isolats ont subi une revivification par repiquage sur deux milieux de culture GLM et Bennett (annexe) à la suite d'une conservation à -20°C en présence de 20% du glycérol. Les boîtes sont incubées à 28 °C pendant 21 jours d'incubation.

Les milieux GLM, Bennett utilisés dans notre travail contiennent des sources de carbone et d'azote nécessaires pour la croissance des actinomycètes et ils ont été utilisés dans de nombreux travaux **Kitouni (2007)**. En effet **Kitouni (2007)** a utilisé GLM et Bennett pour un isolement sélectif de 45 souches d'actinomycètes à partir des écosystèmes variés. De même **Boudemagh (2007)** a pu isoler une variété de *Streptomyces* à partir des écosystèmes extrêmes, tandis que **Boussaber et al. (2012)** ont utilisé GLM et Bennett pour l'isolement de 25 souches d'actinomycètes possédants une activité antifongique importante.

Après ensemencement sur les différents milieux de culture gélosés (GLM et Bennett) les colonies de nos souches apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 28°C.

Pour les deux milieux utilisés, nous observons une différence importante de la taille des colonies de la flore actinomycétale repiquées. Cette différence peut être expliquée par l'affinité entre les bactéries et les milieux de culture utilisés.

Les colonies sont rondes à contours irréguliers, opaques, d'aspect corné et de surface poudreuse. Les colonies adhérentes fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension.

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

Après 14 jours d'incubation de ces souches, le mycélium aérien présente une gamme de couleur assez variée blanc, beige, marron, noir, jaune, gris. Ceci représente un critère de détermination du genre des *Streptomyces* (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Williams et Wallington, 1984**).

Le mycélium est responsable de la formation des sporophores simples, qui produisent des chaînes de spores, cela a pu être observé au microscope optique ou l'observation permet d'apprécier l'organisation de la chaîne de spores.

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

Les souches A6, A19, A26, A32 produisent des pigments beige, beige-marron pour A14 et marron pour A16 avec beige-jaune pour A18.

Ces pigments peuvent être des substances bioactives selon **Margalith (1992)** qui a rapporté que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune.

La souche A20 secrète un pigment brun noir qui est la mélanine, la production des pigments mélanoides est une caractéristique très importante pour les actinomycètes où elles sont considérées comme une clé pour la classification des *Streptomyces* (**Shirling et Gottlieb, 1972**).

D'après **Margalith (1992)**, la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat, la tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation le produit final est l'acide 5,6-dihydroxynidol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur noire.

L'observation au microscope optique des hyphes du mycélium végétatif des souches A6, A14, A18, A19, A20 montre que les filaments sont taille moyenne, peu ramifiés et fragmentés. Ils se développent en surface et pénètrent dans la gélose, puis donnent naissance à un mycélium aérien.

D'après **Williams et al., (1989)**, les *Streptomyces* sont des bactérie aérobies a coloration de Gram positive, qui poussent en produisant un mycélium végétatif ( mycélium de substrat) ramifié et un mycélium aérien portant des chaines d'arthrospores. Les mycéliums de substrat et les spores peuvent être pigmentés, mais peuvent produire également des pigments diffusibles.

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode 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.

Cette activité a été testée vis-à-vis des bactéries tests provenant de l'American Type Culture Collection (ATCC), il s'agit des bactéries à Coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Bacillus subtilis* ATCC10876), et des bactéries à coloration de Gram négative (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC2592).

Les résultats (**Tableau 15**) obtenus montrent que les 8 isolats montrent un pouvoir inhibiteur contre au moins deux germes cibles testés.

Selon **Lemriss et al. (2003)**, l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes dépend de la méthode utilisée. La méthode des cylindres d'agar se prête mieux à la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes testées.

Nos résultats montrent que *Bacillus subtilis* était inhibée par les 8 souches d'actinomycètes testées. Les diamètres des zones d'inhibitions obtenus allant de 07 et 38 mm.

Sept souches d'actinomycètes parmi les 8 testées ont une activité contre *S. aureus* avec des zones d'inhibition comprises entre 08 et 34 mm de diamètre. Ceci est en accord avec les travaux de **Benbrika et Djellouli (2011)** qui ont obtenus des zones d'inhibitions de diamètres allant jusqu'à 30 mm avec une souche de *Staphylococcus aureus*.

De même, *L. monocytogenes* est inhibée par les 8 souches d'actinomycètes testées avec des zones d'inhibitions comprises entre 9 et 30 mm de diamètre.

Par contre la souche à Gram négatif *E. coli* a été inhibée par 4 souches seulement parmi 8 (A6, A19, A26, A32) avec des zones d'inhibition allant de 11 à 20 mm de diamètre. Des résultats similaires sont mentionnés par **Zerizer et al. (2005)** où 2 souches parmi les 10 isolats de sols arides de la région de Biskra sont actives contre *E. coli* avec des zones d'inhibition de 12 et 18 mm de diamètres. Les résultats obtenus par **Oskay et al. (2004)** ont montrés que sur un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie, seulement deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition entre 15 et 26 mm.

Les 8 souches pures d'Actinomycètes sont mises en culture pour produire des métabolites secondaires. La culture par fermentation sur milieu solide a été adoptée en utilisant le milieu AF solide.

---

Les Actinomycètes en culture AF synthétisent alors des substances dites « métabolites secondaires » après 8 à 14 jours d'incubation à 28°C. Ces substances sont dispersées dans le milieu de culture et sont extraites avec le solvant organique. Puis la culture par fermentation à été macérée avec 25 ml de méthanol pendant 2 heures. La filtration et la centrifugation de l'extrait est indispensable pour débarrasser les cellules vivantes présents dans l'extrait.

L'étude de l'activité des extraits des Actinomycètes a été portée sur des souches de références composées de 3 bactéries Gram positif (*B. subtilis* ATCC10876, *S. aureus* ATCC 25923, *L. monocytogenes* ATCC15313, et une bactérie Gram - *E. coli* ATCC25922) par la méthode de diffusion sur gélose.

Cette méthode permet, d'une part de démontrer si un extrait est actif ou non et d'autre part si la substance active est un composé exo-cellulaire ou endo-cellulaire. L'extrait imprégné dans les disques se propage sur la gélose de façon radiale inhibant ainsi la croissance des germes.

L'inhibition est représentée sous forme de zone claire (zone d'inhibition) sur la culture microbienne. Elle permet également de déterminer la sensibilité d'une souche à un extrait donné par la mesure des diamètres de ces zones d'inhibition. La sensibilité du germe à l'égard de l'extrait est d'autant plus importante que le diamètre de la zone d'inhibition est grande (**Andriambololona, 2010**).

Tous les extraits méthanoliques étudiés des 8 souches présentent des activités antibactériennes (**Tableau N°19**), avec des zones d'inhibitions de 20 mm, contre *B. subtilis*, 17mm contre *S. aureus*, 16mm, contre *L. monocytogenes*, 14 mm contre *E.coli*. Ceci montre que l'extraction à partir de milieu solide est largement plus rentable que celle du milieu liquide. En effet, la production d'antibiotiques à partir de milieu solide est généralement plus importante quantitativement et qualitativement que celle en milieu liquide. Il existe même des microorganismes producteurs d'antibiotiques sur milieu solide qui perdent cette capacité en milieu liquide (**Shomura et al., 1979**). Cette différence est due à la physiologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces se* fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin, 1999**), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* (**Bussari et al. 2008**).

---

L'objectif principal de ce test spectral c'est pour faciliter et déterminer le choix de système solvant (la phase mobile) pour le test suivant qu'est la chromatographie sur couche mince.

Les spectres UV-visible des extraits méthanolique brut actifs des souches A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26.A32, sont présentés dans les figures (39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46) suivante respectivement.

Ces spectres UV-Visible des antibactériens sont réalisés pour mettre en évidence la présence des doubles liaisons conjugués dans la structure chimique des antibactériens autrement dit savoir si ces antibactériens sont de structure polénique ou non polyénique.

Les polyènes présentent des spectres caractérisés par une série de pics entre 290-405 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 brut méthanoliques des souches A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26.A32 montrent l'absence de pics caractéristiques des polyènes dont les maxima d'absorption sont obtenus respectivement à 220 nm pour l'extrait de la souche A6, 215 nm pour l'extrait de la souche A14 et A18, 225nm, 235nm, 245nm, 275nm pour l'extrait brut de la souche A16, 221nm pour l'extrait de la souche A19, 205nm pour l'extrait brut de la souche A20, 219nm, 225nm pour l'extrait brut de la souche A26 et enfin 229nm pour l'extrait méthanolique brut de la souche A32.

Ces résultats nous a permettons de conclure que les molécules produites par les 8 extraits sont de nature non polyénique.

Selon **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 même caractéristiques spectrales ce qui nous confirme la contenance des extraits actifs bruts de plus d'un type de molécules.

En plus plusieurs travaux ont montré que les molécules antibiotiques synthétisées par des *Streptomyces* possèdent un maximum d'absorption en UV à des longueurs d'onde situées entre 215 et 270 nm (**Ilic et al., 2005 ; Saisivam et al., 2008 ; Atta, 2009**).

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'adsorption, la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progressent le long d'une phase stationnaire. La constante de migration caractéristique de chaque tache 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 tâche et la distance parcourue par le front du solvant depuis la ligne de dépôt (**Lousif, 2011**)

D'après nos résultats nous avons constaté qu'aucune migration n'est observée pour les extraits avec les systèmes solvants suivante : Toluène-acétone (6 :4), N-butanol-acide acétique-eau (3 : 1 : 1) et Toluène- méthanol (5 :5) Toluène- acide acétique (8 :2), Par contre les travaux de **Boughachiche, (2012)** est obtenue entre 1et 4 tache dans les 4 systèmes de solvants précédant.

D'après les rapports frontaux pour chaque tâche des extraits A14, A16, A18, A19, A26, le système solvant Acétate d'éthyle- méthanol est le meilleur. De même dans les travaux **Boughachiche (2012)** le système solvant Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4) était le meilleur système permettant une migration rapide des molécules biactives et une bonne séparation et donc une bonne purification des extraits méthanoliques. En plus les taches qui possèdent le même *R<sub>f</sub>* 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.

Pour le système solvant Déchlorométhane –méthanol (8,2) seulement l'extrait de la souche **A16** qui donne une seule tache avec *A<sub>f</sub>* (0,27) absorbant à 365nm .Par contre les travaux d'**Andriambololona (2010)** ont montré la présence de 5 taches des extrais méthanoliques avec le même système de solvant.

Pour les extraits méthanoliques des souches **A6, A20, A32**, aucun système de solvant parmi les 6 testés n'a donné une séparation. Ceci peut être justifié par la nature totalement différente des composés contenus dans ces extraits. Ces résultats font appel à d'autres techniques de séparation convenables aux substances de nature protéiques notamment l'électrophorèse.

D'après les résultats de la bioautographie (**Tableau 21**) et parmi les 19 taches obtenues, 6 taches seulement montrent une activité antibactérienne contre *S. aureus* avec des zones

d'inhibition allant de 10- 15 mm, dont 2 / 5 taches de l'extrait A14, 1/ 4 taches de l'extrait A16, 1/5 taches de l'extrait A18, 1/2 taches de l'extrait A19 et 1 tache de l'extrait A26. **Lousif (2011)** a remarqué la diminution du diamètre de la zone d'inhibition après la migration sur le gel dans la plaque CCM ce qui est expliqué par la réduction de leur concentration lors de la séparation.

L'analyse par CPG des composés actifs séparés par la CCM nous orienté vers les premières étapes de l'identification de la molécule bioactive.

Pour la souche A14, le composé actif séparé par CCM et analysé par CPG à donné des pics aux temps de rétentions (Tr) 13,755 min, 13,742 min , ces ( Tr) correspond à diethylphthalate ( $C_{12}H_{14}O_4$ ) qui possède le Tr 13.778 min, qui est un agent Antimicrobienne selon les travaux de **Nandhini et al., 2015**. Le pic avec les Tr 16,678 min correspond de dibutyl phthalate qui possède le Tr 16,608 min, qui est une substance qui éliminer les cellules tumorales sur la moelle osseuse, l'agent de purge dans la transplantation de moelle osseuse autologue, activité cytotoxique (**Kesavan et al., 2014**).

Pour la souche A16, le composé actif séparé par CCM et analysé par CPG à donné un pic à temps de rétention (Tr) 13,758 min, ce Tr correspond à diethylphthalate ( $C_{12}H_{14}O_4$ ) qui possède le Tr 13.778 min, qui est un agent Antimicrobienne selon les travaux de (**Nandhini et al., 2015**).

Pour la souche A18, le composé actif séparé par CCM et analysé par CPG à donné un pic à Tr 11,972 min, ce Tr correspond à marinomycins qui possède le Tr 11.983min, Selon (**Davies et al., 2015**).

Le pic à Tr (13,792 min), correspond à diethylphthalate ( $C_{12}H_{14}O_4$ ) qui possède le Tr 13.778, qui est un agent Antimicrobienne selon les travaux de (**Nandhini et al., 2015**).

Le pic à Tr 16,679 min, correspond à dibutyl phthalate qui possède le Tr 16,608 min, qui est une substance qui éliminer les cellules tumorales sur la moelle osseuse, l'agent de purge dans la transplantation de moelle osseuse autologue, activité cytotoxique (**Kesavan et al., 2014**).

Et en fin le pic à Tr 18,620 min, correspond à Streptomycin qui possède un Tr de 18.616 min selon les travaux de (**Davies et al., 2015**).

Pour la souche A19, le composé actif séparé par CCM et analysé par CPG à donné un pic à temps de rétention (Tr) 13,768, correspond à diethylphthalate ( $C_{12}H_{14}O_4$ ) qui possède le Tr 13.778, qui est un agent Antimicrobienne selon les travaux de (*Nandhini et al., 2015*).

Le pic à Tr 18,621 min, correspond à la Streptomycin qui possède un Tr 18.616 min selon les travaux de (*Davies et al., 2015*).

L'extrait méthanolique du composé actif de la souche A26 a présenté 3 pics qui possèdent des temps de rétention (14,287- 14,339). La caractérisation de la molécule bioactive nécessite, peut-être, d'autres techniques de séparation comme CPG-SM, HPLC, HPLC-SM et RMN  $H^1$  et  $C^{13}$ .

*Conclusion*

*Et*

*Perspective*

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée. Cependant leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances. En effet, ces dernières années ont été marquées par une augmentation inquiétante de la multirésistance de bactéries pathogènes, la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées et l'émergence de nouveaux pathogènes. Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules antibiotiques.

Les actinomycètes, bactéries à Gram positif à majorité filamenteuses, 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, qui sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par leur métabolisme secondaire.

Cette étude a pour objectif d'identifier les molécules bioactives contenues dans les métabolites secondaires sécrétés par des actinomycètes isolées à partir du sol des zones arides. Les caractérisations de ces substances se font après le choix des meilleurs solvants d'extraction et de séparation et en se basant sur des techniques spectrales et chromatographiques adéquates.

Les souches d'actinomycètes **A6, A14, A16, A18, A19, A20, A26, A32** identifiées physiologiquement et biochimiquement comme étant des *Streptomyces*.

La méthode de cylindre d'agar s'avère la plus performante dans la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par nos souches d'actinomycètes.

Les métabolites synthétisés par les Actinomycètes sont dispersés dans le milieu de fermentation AF. La récupération de ces métabolites secondaires a été réalisée en utilisant le méthanol. Tous les extraits étudiés présentent une activité antibactérienne. Les diamètres des zones d'inhibition obtenus varient de 14 mm contre *E.coli* à 20 mm contre *B. subtilis* avec 17mm contre *S. aureus* et 16mm contre *L. monocytogenes*.

Les spectres UV-Visible des extraits méthanoliques des 8 souches montrent l'absence des pics caractéristiques des polyènes pour tous les extraits actifs, nous pouvons donc conclure que les molécules produites par ces souches sont de nature non polyénique.

La chromatographie sur couche mince (CCM) nous a montré que parmi les 6 systèmes solvant utilisé, le système Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4) est le meilleur. Il a favorisé une migration rapide des molécules bioactives et une bonne séparation des composés dans les extraits méthanoliques.

Pour le système solvant Déchlorométhane –méthanol (8 ; 2) seulement l'extrait de la souche **A16** a donné une seule tache avec  $R_f(0,27)$  observée à 365nm,

Aucun système de solvant parmi les 6 testé n'a donné une séparation pour les extraits des souches **A6, A20, A32**.

Les résultats de la bioautographie ont montré que parmi les 19 taches obtenues, 6 taches seulement donne une activité antibactérienne contre *S. aureus* avec des zones d'inhibition allant de 10- 15 mm, dont 2 / 5 taches de l'extrait A14, 1/ 4 taches de l'extrait A16, 1/5 taches de l'extrait A18, 1/2 taches de l'extrait A19 et 1 tache de l'extrait A26,

L'activité antibactérienne est observée chez certaines taches et pas dans d'autres ce qui peut être expliqué par la diffusion des molécules bioactives dans le gel ce qui diminue leur concentration sur le chromatogramme après la migration et la séparation.

Les résultats de la chromatographie phase gazeuse (CPG) des composés actifs séparé par CCM nous ont permis de rapprocher nos molécules bioactives aux différentes familles chimiques des substances antimicrobiennes.

Enfin, il serait intéressant, de poursuivre ce travail en caractérisant l'agent bioactif produit par nos souches soit par HPLC ou par résonance magnétique nucléaire (RMN), spectroscopie – IR, spectroscopie de masse.

Les techniques de la biologie moléculaires sont aussi indispensables pour une identification plus précise des actinomycètes actifs. Par hybridation ADN-ADN avec les espèces proches déterminées durant l'étude des gènes codant l'ARNr 16S, pour confirmer qu'il s'agit bien des espèces de *Streptomyces*.

*Références*  
*Bibliographiques*

- 
- **Abd Bagi M.E., Fahal A.H., Sheik H.E., Abdul Wahab O., Taifoor M.K. and Osmanr E.M. (2003).** Pathological fractures in mycetoma. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 97 (5), 582-584. *Actinomycetologica.* 9:98-117.
  - **Ambaye A., Kohner P.C., Wollan P.C., Roberts K.L., Roberts G.D. and Cockerill III F.R. (1997).** Comparaison of Agar dilution, broth microdilution, disk diffusion, E-test, and BACTEC radiometric methods for antimicrobial susceptibility testing of clinical isolates of the *Nocardia asteroides* complex. *J. Clin. Microbiol.* 35 (4), 847-852.
  - **Anderson A. S. and Wellington E. M. H., (2001).** The taxonomy of *streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51:797-814.
  - **Andriambololona T. (2010).** Etudes biologiques et chimiques des métabolismes secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe . Mémoire pour l'obtention du diplôme d'études approfondies de biochimie en Biotechnologie et Microbiologie. Université d'Antananarivo.
  - **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. (1997) .** Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology.* 21: 314-320.
  - **Atta H. M. (2009).** An Antifungal Agent Produced by *Streptomyces olivaceiscleroticus*, AZ-SH514. *World Appl Sci J.* 6 (11): 1495-1505.
  - **Avril J. L. Dabernat H. Denis F. Monteil H. (2000).** Bactériologie clinique 3<sup>ème</sup> Edition. p, 115-116,212.
  - **Avril J.L., Daberna H., Denis F. and Monteil H. (1992).** Bactériologie Clinique. Seconde édition, Marketing, Paris. 490-498.
  - **Azèle F. (2002).** Bactériologie médicale sous la direction de Jean-Pierre. p, 207,228.
  - **Ball S., Bessel C. J., Mortimer A. (1957).** The production of polyenic antibiotics by soil
  - **Barry A.L., Garcia F. Et Thrupp L.D. (1970).** An improves single disk method for testing.
  - **Beaman B.I. and Beaman L. (1994).** *Nocardia* species: host parasit relationships. *Clin. Microbiol. Rev.* 7 (2), 13-264.
-

- **Becker B., Lechevalier M. P. and Lechevalier H.A., (1965).** Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various from - genera of aerobic actinomycetes *App. Microbiol.*, 13., 236\_243.
- **Benbrika S et Djellouli K. (2011).** Activité Antimicrobienne des Actinomycètes Producteurs de Substances Bioactives Isolés des Sols d'Algérie. Mémoire de fin d'études. En vue de l'obtention du diplôme d'Ingénieur d'Etat en Biologie. Option: Génie biologique. Université Amar Telidji Laghouat.
- **Berdy J. (2005).** Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot.* 58 :1-26.
- **Berdy J., (1974).** Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure *Adv. Appl. Microbiol.*, 18, 309-406.
- **Bollag J. M. (1974).** Microbial Transformation of Pesticides. *Adv. Appl. Microbiol.* **18**, 75-130.
- **Bossert I. D. and Kosson D.S. (1997).** Methods for Mesuring Hydrocarbon Biodegradatooon in Soils. In *Manual of Environmental Microbiology*. Eds : Hurst C.J. *et al.* ASM Press, 1997.
- **Boudemagh A., (2007).** Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse pour l'obtention le grade de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université de Mentouri Constantine.
- **Boughachiche F, (2012).** Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkh. Thèse Présentée pour l'obtention le grade de Doctorat en Sciences Option : Biotechnologies Microbiennes. Université Mentouri Constantine.
- **Boughachiche F., Boiron P., Hamdiken H., Reghioua S. Oulmi L. Zerizer H. Kitouni M. Boudemagh A. Boulahrouf A. (2005).** Isolation and molecular identification of actinomycètes flora, of some saharien soils of south east Algeria ( Biskra, El-oued and Ouargla) study of antifungal activity of isolated strains. *J. Myc. Med.* 15,39-44.
- **Boussaber E., Issam M. K., Hilali L., Hilali A. (2012).** Isolement des souches d'Actinomycètes productrices de substances antifongiques. Volume 4N° 120801.
- **Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Viobis G. (1989).** Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In "Biotechnologie des Antibiotiques". Larpent J.P. et Sanglier J.J., Masson, Paris, pp: 33-70.
- **Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S. (2008).** Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 35:49-58.

- 
- **Calamita H. G. and Doyle R. J., (2002).** Regulation of autolysins in teichuronic acid-containing *Bacillus subtilis* cells. *Mol. Microbiol.*44, 601\_606.
  - **Camille D. (2007).** Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire p, 248, 250, 296, 320, 341, 359, 476.
  - **Canu A.et Leclerq R. (2001).** Overcoming bacterial resistance by dual target inhibition: the case of streptogramins. *Cur Drug Targets Infect Disord.* 1: 215-225.
  - **Carey J., Motyl M. and Perlman D.C. (2001).** Catheter-Related Bacteremia due to *Streptomyces* in a Patient Receiving Holistic Infusions. *Emerg. Infec. Dis.* **7 (6)**, 1043-1045.
  - **Carlotti A., Boiron P., Provost P. et Villard J. (1994).** *Nocardia* et bactéries apparentées. *In : Manuel de Bactériologie clinique.* Eds: J. Freney F. Renauld W. Hansen et C. Bollet. 2ème éd. **2**, 811-831.
  - **Carter A.P., Clemon W.M., Brodersen D.E., Morgan-Worren R.J., Winberly B.T. et Ramakrishnan V. (2000).** Functional insights from the structure of the 30S ribosome subunit and its interaction with antibiotics. *Nature.* 407: 340-348.
  - **Cavala M. and Eberlin T. (1994).** Isolement des *Streptomyces* du sol L'operon, XIX, 4,13-17.
  - **Cerniglia C.E. (1992).** Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Biodegradation.* **3**, 351-368.
  - **Chandra R. and Rustgi R. (1998).** Biodegradable polymers, *Prog. Polym. Sci.* **23**, 1273–335.
  - **Chater K.F., Merrick M.J. (1979).** Streptomycètes, in: *Developmental Biology of prokaryotes.* Ed: J.H. PARISH. University of California press, Berkeley and Los Angeles. 93-114.
  - **Chun J., Youn H. D., Yim Y. I., Lee H., Kim. M. Y., Hah Y.C. and Kang S.O. (1997).** *Streptomyces seoulensis* sp. Nov. *Int., J. Syst. Bacteriol.* **47**, 492-498.
  - **Collins C.H., Yates M.D. and Uttley H.C. (1988).** Presumptive identification of nocardiosis in a clinical laboratory. *J. App. Bacteriol.* **65**, 55-59.
  - **Conville P.S., Brown J M., Steigerwalt A. G., Lee j. W., Anderson V.L., Fishbain J. T., Holland S. M. and Witebsky F.G. (2004).** *Nocardia kruczakiae* sp. nov., a pathogen in immunocompromised patients and a member of the "*N. nova* Complex" *J. Clin. Microbiol.* 42 (11), 5139-5145.
  - **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.
  - **Couvarlin P., Goldstein F., Philippon A., Sinot J. (1985).** L'antibiogramme, 1er éd, mpcvidéom, Paris. 343p
  - **Crawford D. I., Lynch J. M., Whipps.J.M., Dusley M. A. (1993).** Isolation and characterization of actinomycètes antagonists of a fungal root pathogen.Appl. Environ. Microbiol.59, 3899-3905
  - **Cross T., ( 1981).** Aquatic actinomycetes : a critical survey of the occurrence growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*50, p. 397-410.
  - **Curry W. (1980).** Human nocardiosis. A clinical review with selected case reports. *Arch. Intern. Med.* 140, 818-826.
  - **Dastager G. S., Agasar D. et Pandey A. (2009).** Production and partial purification of amylase from a novel isolate *Streptomyces gulbargensis*. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 36:189-194.
  - **David J. M. Haldane (2007).** Community Acquired Pneumonia. *In*: Springer US. Medicine 2007. 53:827-840.
  - **Davies O. F., Adeleye I. A., Wang P.G. (2015).** Hyoscyamine-producing marine *Actinomycetes* from Lagos Lagoon sediment. *Asian Pac J Trop Biomed* 5(3): 196-201.
  - **Decre D. et Courvalin P. (1995)** De l'intérêt d'antibiotiques nouveaux. *Bull.Soc. Fr. Microbiol. P*, 160 175.
  - **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. (1995).** Emerging concepts of secondary metabolism in Actinomycetes. *Actinomycetogica.* 9:98-117.
  - **Demain A.L. and Solomon N. A., (1985)** .Biology of industrial micro-organisms. the Benjamin/ cummings publishing company, INC. California .
  - **Dierckx S. and Dewettinck K. (2002).** Seed gums. *In* :. *Biopolymers. Polysaccharides II.* Eds : Vandamme EJ., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim, Germany. 6, 321–343.
  - **El Nakeeb M.A. and Lechvalier H.A (1963).** Selective isolation of aerobic actinomycetes. *Appl.Microbiol.*11.75-77.
  - **Elazhari M., Zerouali K., Elhabchi D., Cohen N., El malki A., Dersi N., Hussar M., Timinouni M., Saile R (2010).** Sensibilité aux antibiotiques des souches de *Staphylococcus*
-

- aureus* communautaires à Casablanca Maroc. Revue Tunisienne d'Infectiologie. Octobre 2010, Vol.4, N°4 : 134 – 140.
- **Ensign J.C. (1978).** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annus. Rev. Microbiol.* **32**, 185-219.
  - **Ensign J.C., Normand p., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Rev. Microbiol.* **144**,p. 657-660.
  - **Eunice J.A. and Prosser J. I. (1983).** Mycelial growth and branching of *streptomyces coelicolor*. A3 (2) on solid medium. *J. gen. Microbial.* **129**, 2029-2036.
  - **Filice G.A. (1993).** Nocardiosis. In: Fungal diseases of the lung. Sarosi G.A., Davies S.F.(Eds). Raven Press, New York. 191-204.
  - **Flandrois (2002).** Bactériologie médical sous la direction de Jean -pierre. p, 207, 228.
  - **Flardh K, Bruttner M. J. (2009).** *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews.* **7**: 36-49.
  - **Focht D.D. (1997).** Aerobic Biotransformation of Polychlorinated Biphenyls. In *Manual of Environm Microbiol.* Eds : Hurst, C.J., et al. ASM Press.
  - **Freland C., Fur C. L., Nemirovsky-Trebucq B., Lelon P. and Boiron P. (1995).** Primary cutaneous nocardiosis caused by *Nocardia otitidiscaviarum*: two cases and a review of a literature. *J. Trop. Med. Hyg.* **98**, 395-403.
  - **Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the prokaryotes. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition. Springer-Verlag. New York.
  - **Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A. and Willeke K. (1998).** Analysis of airborne Actinomycetes spores with fluorogenic substrates. *Appl. Environm. Microbiol.* **64** (11), 4410-4415.
  - **Gersch D., Roemer W., Bocker H. and Thrum H. (1979).** 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.
  - **Getha K., Vikineswary S., Wong W. H., Seki T., Ward A. et Goodfellow M. (2005).** Evaluation of *Streptomyces sp.* strain g10 for suppression of *Fusarium* wilt and rhizosphere colonization in pot-grown banana plantlets. *J Ind Microbiol Biotechnol.* **32**:24-32.

- **Gold W., Stout H. A., Pagano J.S., Donouick R ., (1956).** Amphotericin A and B: Antifungal antibiotic produced by Streptomycete. In vitro studies .Antibiotic Annu 56:579-586. In Allaoueddine Boudemagh. 2007.
- **Goodfellow M., Williams S.T., (1983).** Ecology of Actinomycetes. Annu. Rev. Microbiol.37: 189-216.
- **Gottlieb D., (1973).** General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F. A. Skinner .Academic Press, London, New York.
- **Grafe U., Eritt I., Fleck W.F. (1984).** On the role of A-factor in cytodifferentiation of anthracycline producing strains of *streptomyces griseus*. Actinom. 18, p. 220-246.
- **Green D.W., (2002).** The bacterial cell wall as a source of antibacterial targets. *Expert Opin. Ther.Targets* 6, 1-19.
- **Hacène H., Sabaou N., Bounaga N., Lefevre G. (1994).** Screening for non-polenic antifungal antibiotics produced by rare Actinomycetales. Microbiol. 79: 81.
- **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.
- **Herman T. (2005).** Drug targeting the ribosome. *Curr Opin Struct Biol*. 15(3): 355-366.
- **Hernandez-Coronado M. J., Hernandea M., Centenera F., Perez-Leblic M. I., Ball A. S. and Arais M. E., (1997).** Chemical characterization and spectroscopic analysis of the solubilization products from wheat straw produced by *Streptomyces* strains grown in solid-state fermentation . Microbiol., 147, p. 1359-1367.
- **Higashide E. (1984).** "The macrolides: properties, biosynthesis and fermentation" *Drugs pharm.Sci .*, 22, , pp. 452-508.
- **Hilali L., Khattabi A., Nssrlah N., Malki A., FinanceC. (2002).** Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. Rev. Biol. Biotech. 2 :49-53.
- **Holt RIG, Kwan J.T.C., Sefton A.M. and Cunningham J. (1993).** Successful treatment of concomitant pulmonary nocardiosis and aspergillosis in an immunocompromised renal patient. Euro. J. Clin. Microbiol. Infect Dis. 12, 110-112.
- **Holtz H.A., Lavery D.P., Kapila R. (1985).** Actinomycetales infection in the acquired immunodeficiency syndrome. Ann. Intern.Med. 102 (2), 203-205.

- **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.
- **Ilic S.B., Konstantinovic S.S. et Todorovic Z.B. (2005).** UV /VIS analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Medecine and Biology*. 12(1): 44-46.
- **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.
- **Jacques B. (2001).** Le technicien d'analyses biologiques. Guide théorique et pratique. Londres-paris-New York. p 665, 986, 1051-1052.
- **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
- **Joachin W. (2002).** *The Actinomycetales*, An order of the class of Actinobacteria Important. In: the pharmaceutical industry. *Electronic Manual*.
- **Jung Y.L, Byung K.H. (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48, 407-417.
- **Kesavan S.S., Bavanilatha M., Vijyalakshmi R., Hemalatha S (2014)** .Analysis of bioactive constituents from a new streptomyces variabilis strain Su5 by gas chromatography- mass spectrometry. *Int J Pharm Pharm Sci, Vol 6, Issue 11, 224-226*
- **Khokhlov A.S. (1986).** Actinomycete autoregulators. In : Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Eds : G. Szabo S. Biro M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. 791- 798.
- **Kieser T., Bibb M. J., Buttner M. J., Chater K F. et Hopwood D. A. (2000).** Practical *Streptomyces* Genetics. *The John Innes Foundation, Norwich, UK*: 613.
- **Kim D.W., Chater K., Lee K. J. Hesketh D. (2005).** Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the bldA gene product, a developmentally significant ARNt, reveal a new target for the ropie regpleiotulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J. Baacteriol.* 187(9), 2957-2966.
- **Kimura N. and Urushigawa Y. (2001).** Metabolism of dibenzo-p-dioxin and chlorinated dibenzop- dioxin by a gram-positive bacterium, *Rhodococcus opacus* SAO 101. *J. Biosci. Bioeng.* 92, 138- 143.

- **Kirk O., Dmhus T., Borchert TV., Fuglsang CC. (2005).** Enzyme applications industrial in: seldel A(Ed)-Kirk-Othmer. Encyclopedia of chemical technology. 5th edition, *New-York.Wilet- Interscience. 248(10)*, 317-898.
- **Kitouni M., (2007).** Isolement de bactéries actinomycètes productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse en vue de l'obtention du diplôme de doctorat d'état en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine P16.
- **Kitzis M.D., Gutmann L. and Acar J.F. (1985).** *In-vitro* susceptibility of to 21 b-lactam antibiotics, in combination with three b-lactamase inhibitors, and its relationship to the b-lactamase content. *J. Antimicrob. Chemother. 15*, 23-30.
- **Labro M. (2002).** Cellular accumulation of macrolide antibiotics. Intracellular bioactivity, dans : Kirst H. et Shonfeld W. *Macrolides. Birkhauser Verlag, Basel-Boston-Berlin: 37-52.*
- **Lacey J. (1973).** Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: *Actinomycetales: characteristics and practical importance.* Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York. 231-251.
- **Lacey J., (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agric. Environ. Med. 4*, 113-121.
- **Larpent J. P., Larpent-Gourgaud M. (1990).** *Mémento Technique de Microbiologie.* TEC & Doc Lavoisier. France.
- **Larpent J.-P. et Larpent-Gourgaud M. (1985 b).** *Manuel pratique de microbiologie.* Hermann. Paris. 157-162.
- **Larpent J.P. et Sanglier J.J., (1989).** *Biotechnologie des antibiotiques.* Ed. Masson, Paris p 481.
- **Le Minor L., Veron M. (1989).** *Bacteriologie médicale.* 2<sup>ème</sup> édition. pp 335-349.
- **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.
- **Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1981).** Introduction to the order Actinomycetales. In: *The procaryotes,* Eds : Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Springer-Verlag. Berlin. 2, 1915-1922.
- **Lechevalier H.A., and Lechevalier M.P. (1967).** Biologie of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol. 21*, 71-100.
- **Lechevalier M. P et Lechevalier H. A., (1970).** Chemical composition as a criterion in the clasification of aerobic actinimycetes. *Inter.J . Sys.Bacteriol. 20 (4)*, 435-443.

- **Lechevalier M.P. (1988).** Actinomycetes in agriculture and forestry. In “Actinomycetes. in Biotechnology”. Goodfellow M.G., Williams S.T. & Modarski M. Ed., Academic Press London, New-York, pp: 327-358.
- **Lechevalier M.P. and Lechevalier H. (1985).** Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In : Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, Inc. 315-316.
- **Lemriss S. (2004).** Recherche de substances antifongiques à partir d'une collection de souches d'actinomycètes d'origine clinique et à partir d'une chimiothèque. Thèse pour l'obtention le grade de doctorat d'état en Contrôle Qualité en Bio-industrie et Technologie Enzymatique. Université de Chouaib Doukkali. Faculté des sciences El Jadida.
- **Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin J. M., Saintpierre-Banaccio D., Rifai S., Fassouane A., Boiron P. (2003).** Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* 49; 669-674.
- **Lerner P.I. (1996).** Nocardiosis. *Clin. Infect. Dis.* 22, 891-905.
- **Levreau J. Y. and Buix M., (1993).** Microbiologie industrielle. Les micro-organisme d'intéret industriel. Lavoisier, Paris. Ch : 6 425-481. *Technique et documentation. Lavoisier. Paris.*
- **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.
- **Lin T.C., Young C.C., Ho M.J., Yeh M.S., Chou C.L., Wei YH. and Chang JS. (2005).** Characterization of floating activity of indigenous diesel-assimilating bacterial isolates. *J. Biosci. Bioengin.* 99, 466-472.
- **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.
- **Locci R. (1976).** ^ Developmental micromorphology of actinomycetes ^ . In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. *Arai T. Ed., Tokyo.* 170-180.
- **Lopes A., Coelho R.R., Meirelles M. N. I., Branquinha M. H. and Vermelho A. B. (1999).** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*. Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Men Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro.* 94, 763-770.
- **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.

- **Lousif K (2011).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes, caractérisation préliminaire de molécules bioactives . Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en microbiologie. Option : Microbiologie appliquée et Biotechnologie microbienne. Université Mentouri-Constantine.
- **Lum C. A. and Vadmal M. S. (2003).** *Nocardia asteroides* mycetoma. Ann. Clin. Labo. Sci. **33**, 329-333.
- **Madigan M. T et Martinko J.M (2007).** Biologie des microorganismes. *Pearson Education France*, 11<sup>é</sup> édition : 331-423, 686-718.
- **Madigan M. T., Martinko. J. M., Prker J. (1997).** Biology of microorganisms. Prentice Hall International (Ed).
- **Manteca A., Alvarez R., Salazar N., Yague P. et Sanchez J.(2008).** Mycelium differentiation and antibiotic production in submerged culture of *Streptomyces coelicolor*. *Appl & Environ Microb.* 74: 3877-3886.
- **Margalith P.Z. (1992).** Pigment microbiology. Shapman and Hall. London. p 5,114.
- **Mariat F. et Sebald M. (1990).** Les actinomycètes. In: Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.935-949.
- **Mariat F., Sebald M.(1990)** . Actinomycétales..In: Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine- Sciences. Flammarion. France. Deuxième partie : 933-999.
- **Marinelli F. (2009)** .Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery. *Microbiology today.* 2: 20-23.
- **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.
- **McBride M. J. and Ensign J. C., (1987).** Effects of intracellular trehalose content on *streptomyces griseus* spores.J. Bacteriol. 169(11): 4995- 5001.
- **McNeil M. M, Brown J. M., Jarvis W.R. and Ajelo L. (1990).** Comparison of species distribution and antimicrobial susceptibility of aerobic actinomycetes from clinical specimens. Rev. Infect. Dis. **12**,778-783.
- **Meklat A. Nasserdin S., Zitami A., Florence M., Lebrihi A. (2011).** Isolation, Taxonomy and Antagonistic properties of Halophilic Actinomycètes in saharan solids of Algeria.

- **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.
- **Mitsuiki, S., Sakai, M., Moriyama, Y., Goto, M. et Furukawa, K. (2002)**. Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkalophilic *Nocardiopsis* sp. TOA-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **66**: 164-167.
- **Mohamedi D. (2001)**. Classification et mode d'action des antibiotiques. p, 2.
- **Moore B. S., Trischman J. A., Seng D., Kho D., Jensen P. R. and Fenical W. S., (1999)**. Antiinflammatory Depsipeptides from a marine streptomycetes . *J. Org. Chem.* 64, p. 1145-1150.
- **Mustin M. (1987)**. Le Compost, gestion de la matière organique. Ed : François Dubusc. Paris, 954.
- **Naimi S. (2014)**. Test d'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes éventuellement productrices d'antibiotiques isolées à partir des sols des zones arides dans la région d'El Bayadh. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme d'ingénieur d'états en biologie. Option control de qualité et analyse. Université Dr Moulay Tahar. Saida.
- **Nandhinin U. S., Sangareshwaris S., Lata K (2015)**. Gas chromatography - Mass spectrometry analysis of bioactive constituents from the marine streptomycetes *Asian J Pharm Clin Res*, Vol 8, Issue 2, 2015, 244-246.
- **Nassif. (2003)**. Bactériologie systématiques. Université Paris-VI Pierre et Marie Curie. Faculté de Médecine Pitié-Salpêtrière. Service de Bactériologie. DCEM1.p, 73.
- **Niemi G.J. and Veith G.D. (1989)**. An Approach for Development of Structure-Biodegradation Relationships of Organic Chemicals. *Aquat. Toxicol. Environm. Fate.* **11**, 459-467.
- **Ninet L., Verrier J. (1960)**. *Production of spiramycin*. United States Patent (N°2, 943,023).
- **Nishino S.F. and Spain J.C. (1997)**. Biodegradation and Transformation of Nitroaromatic Compounds. In: Manual of Environmental Microbiology. Eds : Hurst, C.J. *et al.* ASM Press.
- **Nodwell J.R. and Losick R. (1998)**. Purification of an extracellular signaling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 180 (5), 1334-1337.
- **Oiwa R. (1992)**. Antibacterial agents, dans : Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. *Spring-Verlag, New York*: 1-29.
- **Okami Y. and Hotta K. (1988)**. "Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». *Academic Press, Orlando* (Ed.), pp.33-67.

- **Okami Y. and Okazaki T., (1978).** Actinomycetes in marine environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 6, p. 145-152.
- **Olson E. et Rattzkin B. (1999).** Pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 10: 525-527.
- **Omura S. (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc.281-303.
- **Oskay M., Tamer A.U. and Azeri C. (2004).** Antibacterial activity of some actinomycètes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology* Vol. 3(9), pp, 441-446.
- **Ottow J. C.G. and Glathe H. (1968).** Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 16, 170-171.
- **Ouhdouch Y, Barakate M, Finanse C. (2001).** Actinomycetes of Moroccan habitats: Isolation and screening for antifungal activities. *Eur. J. Soil Biol.* 37: 69-74.
- **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.
- **Pelmont J. (1993).** Bactéries et environnement - Adaptations physiologiques. *Presses Universitaire de Grenoble.* 899.
- **Pelmont., (1994).** Recherche de substances antibactériennes d'une collection de souches d'actinomycètes caractérisation préliminaires de molécules bioactives. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologie Microbienne. Université Mentouri Constantine. P 12.
- **Perry J.J., Staley J.T. and Lory S. (2004).** Microbiologie, cours et questions de révision. Dunod. Paris. 497-850.
- **Perschak H., Gubler J., Speich R., Russi E. (1991).** Pulmonary nocardiosis concurrent with *Pneumocystis carinii* pneumonia in two patients undergoing immunosuppressive therapy. *J. Infec.* 23, 183-185.
- **Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madriral A., Huitron C., Flores M. E. (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., axylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* p53, 269-273.(2003).
- **Pine L., (1970).** Classification and phylogenetic relationship of microaerophilic actinomycetes. *Int. J. Bacteriol.* 20, p. 445-474 .
- **Pirouz T., Karbasian M.A. and Goodfellow M. (1999).** Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan County, South-East of Iran. *Irn. J. Med. Sci.* 24, p. 65-67 .

- 
- **Porter J. N., Wilhem J. J. and Tresner H. D. (1960).** Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* p, 8,174.
  - **Porter J.N. (1971).** Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.* **14**, 73-92.
  - **Presant C.A., Wiernik P.H. and Serpick A.A. (1973).** Factors affecting survival in nocardiosis. *Am. Rev. Respir. Dis.* **108**, 1444-1448.
  - **Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A., (2003).** Microbiologie. De Boeck & Larcier. Fran.
  - **Prescott L. M., Harly J. P., Klein D. A. (1995).** Microbiologie. 2th ed . Debroeck-wesmael. Bruxelles.
  - **Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A. (2007).** Microbiologie. *De Boek & Larcier, Bruxelle* : 805-825.
  - **Rakotoniriana E.F. (2006).** Les microorganismes endophytes : sources potentielles de nouveaux taxa et de composés bioactifs. [Mémoire de DEA : Biologie et Ecologie Végétale] Antananarivo : Université d'Antananarivo, 48p.
  - **Ralet M.C., Bonnin E. and Thibault J.F. (2002).** Pectins. In: Biopolymers. Polysaccharides II. Eds : Vandamme E.J., De Baets S., Steinbüchel A. Weinheim, Germany: Wiley-VCH.
  - **Randerath K. (1971).** Chromatographie sur couches minces. Paris : édition Gauthier-Villars. 399p.
  - **Reponen T.A., Gazonko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. and Cole E.C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycetes spores. *Appl. Environm. Microbiol.* **64**, 3807-3812.
  - **Roher S. and Berger-Bachi B., (2003).** FemABX peptidyl transferases: a link between branched-chain cell wall peptide formation and beta lactam resistance in gram- positive cocci. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**,837-846.
  - **Saisivam S., Bhikshapathi D.V., Krishnaveni J. et Kishan V. (2008).** Isolation of borrelidin from *Streptomyces californicus*-An Indian soil isolate. *Indian J Biotechnol.* 349-355.
  - **Sanglier J. J. et Trujillo M., (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc . Fr. Microbiol.*, 12, (13).
  - **Sanglier J. J., Huck T. A. and Fehr T., (1993).** Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988- 1992). *Res. microbiol.* **144**,633-642.
  - **Saubolle M. A. and Sussland D. (2003).** Nocardiosis: Review of Clinical and Laboratory Experience. *J. Clin. Microbiol.* **41**, 4497–4501.
-

- **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
- **Shartz A., Bugie E., Waksman S.A. (1944).** Streptomycin, a substance exhibiting antibiotic activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **55**, 66-69.
- **Shirling E. and Gottlieb D. (1972).** Cooperative description of type strains of strains of *Streptomyces*. *Intern. J. Syst.* **22**, 265-394.
- **Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966).** Methods for characterisation of *Streptomyces* species. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* **16(3)**, 313-340.
- **Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M. et Nida T.(1979).** Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot.* **32**: 427-435.
- **Silvey J.K.G and Roach A.N. (1975).** The taste and odour producing aquatic actinomycetes. *Crit. Rev. Environ. Control.* **5**. 233-273.
- **Simonet M. (1991).** *Nocardia* In : Bactériologie. Berche P., Gaillard J. L. and Simonet M. (Eds). Flammarion Médecine-Sciences, Paris. 338-343.
- **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. P , 5-7.
- **Song j., Weon H.Y., Yoon S.H., Parrk D.S., Go S.J. and Suh J.W. (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic Actinomycetes and *Thermoactinomycetes* isolated from mushroom composts in korea based on 16s r RNA gene sequence analysis. *FEMS. Microbiol. Lett.***202**, 97-102.
- **Stackebrandt E. Rainey F.A. and Ward-Rainey N.L., (1997).** Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *j. Syst.Bacteriol.* **47**, 479-491.
- **Stapley E.O., Woodruff H.B, (1982).** Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolate from a soil Japan. In : *Trends in antibiotic Research*. Japan: 154-170.
- **Stoks S.M. et Thomas C.R. (2001).** Viability, strength and fragmentation of *Saccharopolyspora erythrae* in submerged fermentation. *Biotechnol and Bioeng.* **75** (6):702-709.
- **streptomycetes. Journal of General Microbiology. 17: 96-103.**

- **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.
- **Suutari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalailen A. (2002).** Media for cultivation of indoor *streptomycetes*. *J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.
- **Suzuki S.I. (2001).** Establishment and use of gellan gun media for selective isolation and survey of specific rare Actinomycetes. *Actinomy.* 15(2), 55-60.
- **Swaney S. M., Aoki H., Ganoza M. C. and Shinabarger D. L., (1998).** The oxazolidinone linezolid inhibits initiation of protein dynthesis in bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* . **42**(12): 3251-5.
- **Sy M.H., Diouf A.G., Diakhate I., Dangou J.M., Dieng M.T., Barberet G., Ndiaye A., Diem C.B., Dansokho A.V. and Seya S. (2003).** Ostéite mycétomique et mycétomes osseux. e-mémoire de l'Académie Nationale de Chirurgie 2 (2), 11-17.
- **Sykes G. and Skinner F. A., (1973).** Actinomycetales: Characteristics and pratical importance. *Academic press. London. New York*.
- **Sylvie C. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important *Pharmactuel Vol. 42* Supplement 2 Decembre 2009. p, 10.
- **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.
- **Takizawa M., Cowell R.R. and Hill R.T. (1993).** Isolation and diversity of Actinomycetes in the Chesapeake Bay. *Appl. Envirnm. Microbiol.* **144**, 647-651.
- **Theilleux J., (1993).** In Levreau J. Y., Bouix M.O. Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoiser. France. Ch 6: 425-481.
- **Thirupl L., Johsen K. and Winding A. (2001).** Succession of indigenus *Pseudomonas spp.* and *Actinomycetes* on barley roots affected by the antagonistic strain *Pseudomonas fluorecens. DR54* and the fungicide imazalil. *Appl. Env. Microbiol.* **67** (3), 1147-1153.
- **Thomas A. H. (1976).** Analysis and assay of polyene antifungal antibiotics. *A review. The analyst.* 101: 321-340.
- **Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. (2003).** Introduction a la microbiologie . *Edition de Renouveau pédagogique, Québec*: 602-632.
- **Vernin G. (1970).** Chromatographie sur couche mince : techniques et applications en chimie organique. Paris: Dunod. 178p.

- 
- **Vining L.C. (1992).** Secondary metabolism: Inventive evolution and biochemical diversity. *Gene*. **115**:135-140.
  - **Wacksman S.A., Woodruff H.B. (1940)** .The soil as a source of microorganisms antagonistics to disease producing bacteria. In “Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology”. Williams & Wilkins Eds. Vol. 4, pp: 2333-2648.
  - **Waksman S. A., (1963).** Ma vie avec les microbes. Albin Michel Ed. p 280.
  - **Waksman S.A. (1959).** The actinomycetes : nature, occurrence and activities, Williams and Wilkins. Company, Baltimore. **1**, 29-46.
  - **Wallace R.J., Brown B.A., Blacklock Z., Ulrich R., Jost K., Brown J.M., McNeil M., Onyi G., Steingrube V. A. and Gibson J. (1995).** New *Nocardia* taxon among isolates of *Nocardia brasiliensis* associated with invasive disease. *J. Clin. Microbiol.* **33** (6), 1528-1533.
  - **Walsh C., Traujer 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.*
  - **Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. et Bhole B.D (2001).** How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch Microbiol.* **176**: 386-390.
  - **Williams S. T., Sharples G. P. and Bradshaw R. M., (1973).** The fine structure of actinomycetales , p. 113-130. In; Sykes G. and Skinner F. A. (ed). *Actinomycetales : Characteristics and practical importance* . Academic Press. Inc., New York, N.y.
  - **Williams S.T. and Cross T., (1971).** Actinomycetes. In: *Methods in microbiology. Booth C. Ed., Academic Press, London.***4**, 295-334.
  - **Williams S.T. and Davies F.L. (1965).** Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J. Gen. Microbial.* p, **38**, 251-261.
  - **Williams S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H. (1984).** Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes.* Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski et S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481-528.
  - **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.
  - **Woo J. H., Kitamura E., Myouga H. and Kamei Y., (2002).** An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *pythium porphyrae*, a
-

- causative agent of red rot disease in *porphyrae spp.* Appl. Environ. Microbiol., 68,2666-2675.
- **Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N.(2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medicine de Maghreb.* N° 91.
  - **Zaitlin B., Watson S.b., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* **95 (2)**, 113-118.
  - **Zeghilet N (2009).** Optimisation du paramètre de détection et de quantification des résidus d'antibiotique dans la viande blanche par chromatographie liquide haute performance (HPLC). Thèse pour l'obtention du diplôme de Magister en médecine vétérinaire option: hygiène alimentaire p16.
  - **Zerizer H., Oulmi L., Boughachiche F., Reghioua S., Boudemagh A., Kitouni M., Boulahrouf A. (2005).** Identification d'une Actinomycétale productrice d'antibactérienne isolée de sols Arides de la région de Biskra. *Laboratoire de Génie Microbiologique et application –Faculté des sciences-Université Mentouri-Constantine. Algérie.* Ch 6 : 155-178.
  - **Zermane F. (2008).** Etude des caractéristiques culturelles des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose des substances pectiques et des composés organiques de synthèse. Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de magistère en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine.
  - **Zimmerman W. (1990).** Degradation of lignin by bacteria. *J. Biotechnol.* 13, 129-130.

# *Annexe*

---

**Milieux de culture****Bennett**

Extrait de levure	1g
Extrait de viande de bœuf	1g
Peptone pancréatique de caséine	2g
Glucose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7.3

**Glucose - Extrait de levure-Malt (GLM)**

Extrait de levure	3g
Extrait de malt	3g
Peptone	5g
Glucose	10g
Agar	20g
Eau distillée	1000ml

pH 7.2

**Mueller Hinton**

Extrait de viande	2g
Hydrolysate acide de caséine	17,5g
Amidon	1,5g
Agar	10g
Eau distillée	1000ml

pH 7,4

---

**Bouillon nutritif**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
Na Cl	5 g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,2

**Gélose nutritive**

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Agar	15-20g
Eau distillée	1000 ml

pH 7,2

**Milieu AF**

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
Glucose	2g
NaCl	2,5 g
CACO <sub>3</sub>	1g
Agar	15g
Eau distillée	1000ml

pH 7

---

**Standard McFarland 0,5**

Chlorure de baryum dihydrate ( $\text{BaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) 1,175%	0,05 ml
Acide sulfurique ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) 1%	9,95 ml

**Eau physiologie**

Na Cl	9g
Eau distillée	1000ml

**Les colorants****Lugol**

Iode	1g
Iode de potassium	2g
Eau distillée	300m

**Violet de gentiane**

Violet de gentiane	1g
Ethanol à 90	10g
Phénol	2g
Eau distillés	1000ml

**Fuchsine**

Fuchsine basique	02g
Acide phénique	10g
Alcool absolu	20ml

# Édition 1995 ANTIBIOGRAMME PASTEUR

technique des disques par diffusion en gélose pour les bactéries à croissance rapide (18 à 24 h)

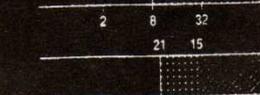
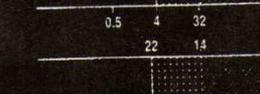
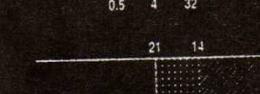
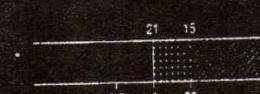
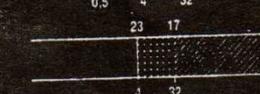
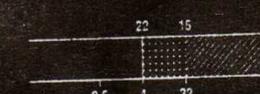
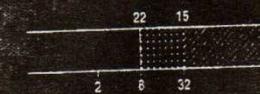
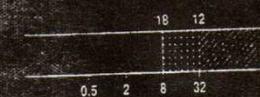
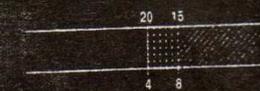
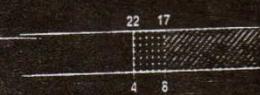
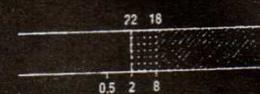
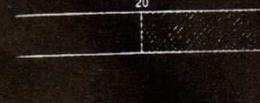
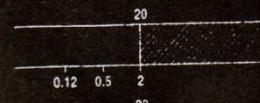
DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS (liste indicative)	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	diamètre (mm) SENSIBLE INTERM. RESISTANT CMI (mg/l)
<b>PENICILLINES</b>				
<b>Pénicillines G</b>	Réponse valable pour toutes les pénicillines G			
Pénicilline G	Extencilline, Oracilline, Ospen, Pénicilline G	6 µg (10 U.I.)	P	29 8 0.25 16
<b>Aminopénicillines</b>				
Ampicilline et dérivés (Entérobactéries)	Bacampicine, ES-Ampicilline, Penglobe, Pénicline, Proampi, Suvipen, Totapen	10 µg	AM	17 11 4 16 17 11
Ampicilline * (3) + Sulbactam		10 µg + 10 µg	FAM	4 16 21 14
Amoxicilline	Agram, Amodex, Amophar, Bactox, Bristamox, Clamoxil, Fiemoxil, Gramidil, Hiconcil, Zamocilline	25 µg	AMX	0.25 1 4 16 21 14
Amoxicilline (4) + Ac. clavulanique	Augmentin	20 µg + 10 µg	AMC	4 16
<b>Carboxypénicillines</b>				
Ticarcilline (en I.V.) (Entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i> )	Ticarpen	75 µg	TIC	22 16 16 64
Ticarcilline (5) + Ac. clavulanique (Entérobactéries et <i>P. aeruginosa</i> )	Claventin	75 µg + 10 µg	TCC	22 18 16 64
<b>Acyluréidopénicillines</b>				
Mezlocilline	Baypen	75 µg	MZ	21 16 2 8 32 128 20 12
Pipéracilline (en I.V.) (Entérobactéries)  - <i>P. aeruginosa</i>	Pipérilline	75 µg	PIP	8 64 18 12 16 64
Pipéracilline (6) + Tazobactam - Entérobactéries  - <i>P. aeruginosa</i>	Tazocilline	75 µg + 10 µg	TZP	21 14 8 64 19 14 16 64

BETA-LACTAMINES

DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS (liste indicative)	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	
Résultats valables pour les pénicillines M et les céphalosporines étudiées à 30 °C ou sur milieu hypersaté à 37 °C				
<b>Pénicillines M</b> (Staphylocoques)		5 µg	OX	
Oxacilline Cloxacilline Dicloxacilline	Bristopen, Orbénine, Diclozil			
Oxacilline (pneumocoque)	Sensibilité diminuée à la pénicilline	1 µg	OX1	
<b>Amidinopénicilline</b>				
Méclilnam (Entérobactéries et sur milieu de Mueller Hinton)	Selexid	10 µg	MEC	
<b>Carbapenem</b>				
Imipénème	Tienam	10 µg	IPM	
Méropénème		10 µg	MEM	
<b>CEPHALOSPORINES</b>				
Céfaloine Céfaloridine Céfacétriile* Céfapirine* Céfazoline	Céfaloine, Kéflin Céporine Célosper Céfoject Céfacidal, Céfazoline, Kefzol	30 µg	CF CD CAC CP CZ	
Céfamandole Céfuroxime	Kéfandol Curoxime	30 µg	MA CXM	
Céfoxitine	Méfoxin	30 µg	FOX	
Céfotiam	Pansporine	30 µg	CTF	
Céfotétan	Apacef	30 µg	CTT	
Céfotaxime (7) Cefménoxime (7) Ceftizoxime* (7) Ceftriaxone (7) Ceftazidime (7)	Claforan Cémix Cefizox Rocephine Fortum	30 µg	CTX CMX CZX CRO CAZ	
Céfopérazone	Céfobis	30 µg	CFP	
Cefsulodine - <i>P. aeruginosa</i>	Pyocéfal	30 µg	CFS	
Céfépime (7) Cefpirome (7)	Axepim Cefrom	30 µg	FEP CPO	
Latamoxef	Moxalactam	30 µg	MOX	

BETA-LACTAMINES

diamètre (mm)  
SENSIBLE INTERM. RESISTANT  
CMH (mg/l)



DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS (liste indicative)	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	diamètre (mm)		
				SENSIBLE	INTERM.	RESISTANT
				CMI (mg/l)		
<b>CÉPHALOSPORINES ORALES</b>						
Céfadroxil* Céfalexine	Oracéfal Céfacet, Céporexine, Keforal	30 µg	CFR CN	18	12	
Cefaclor*	Alfatil	10 µg	CEC	22	16	
Cefatrizine*	Cefaperos	10 µg	CFT	2	8	
Loracarbef		10 µg		22	15	
Cefuroxime-axétil (8)		10 µg	CXM	2	8	
Céfixime (7)	Oroken	10 µg	CFM	23	14	
Cefpodoxime (7) (8)	Cefodox, Orelox	10 µg	CPD	2	8	
Ceftibutène		10 µg	CTB	26	20	
<b>MONOBACTAME</b>						
Aztréonam	Azactam	30 µg	ATM	1	4	
				25	22	
				1	2	
				24	21	
				1	2	
				20	16	
				2	8	
				23	17	
				0,5	4	32



	DÉNOMINATIONS COMMUNES	NOMS DE SPÉCIALITÉS (liste indicative)	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	
QUINOLONES	Acide nalidixique (10)	Négram	30 µg	NA	<p>diamètre (mm)</p> <p>SENSELESS WATER RESISTANT</p> <p>CMI (µg/2h)</p> <p>20 15</p> <p>4 8 16</p> <p>20 17</p> <p>1 2 4</p> <p>25 21</p> <p>2 4 8</p> <p>19 14</p> <p>4 8 16</p> <p>21 12</p> <p>0.12 1 8</p> <p>22 16</p> <p>1 4</p> <p>22 19</p> <p>1 2</p> <p>22 16</p> <p>0.25 1 4</p> <p>22 19</p> <p>1 2</p> <p>20 16</p> <p>1 2</p> <p>19 14</p> <p>0.25 1 4 16</p> <p>22 15</p> <p>0.25 2 16 128</p> <p>15</p> <p>4</p> <p>30 12</p> <p>1 32</p> <p>14</p> <p>32</p> <p>17</p>
	Acide oxolinique (10)	Urotrate	10 µg	OA	
	Fluméquine (10)	Apurone	30 µg	UB	
	Acide Pipémidique (10)	Pipram	20 µg	PI	
	Norfloxacine (10)	Noroxine 400	5 µg	NOR	
	Loméfloxacine (10)	Logiflox	5 µg	LOM	
	Enoxacine (10)	Enoxor	5 µg	ENX	
	Péfloxacine (12) Ofloxacine (12)	Péflacine Oflozet	5 µg	PEF OFX	
	Ciprofloxacine (12)	Ciflox	5 µg	CIP	
	Sparfloxacine	Zagam	5 µg	SPX	
DIVERS	Rifampicine	Rifadine, Rimactan	30 µg	RA	
	Acide Fusidique	Fucidine, Fucithalmic	10 µg	FA	
	Métronidazole Ornidazole Tinidazole	Flagyl, Métronidazole Fandre, Rozex Tibéral Fasigyne	4 µg	MTR	
	Nitroxoline	Nibiol	20 µg	NI	
	Fosfomycine (en i.v.)	Fosfocine	50 µg	FOS	
	Vancomycine (13) Teicoplanine (13)	Vancocine, Vancomycine Targocid	30 µg	VA TEC	

DÉNOMINATIONS COMMUNES		NOMS DE SPÉCIALITÉS (liste indicative)	CHARGE DU DISQUE (1)	SIGLE DU DISQUE	
MACROLIDES	Erythromycine (9) X	Abboticine, Biolid, Emestid, Ery, Erycoci, Eryfluid, Eryphar, Erythrocline, Erythrogel, Erythrogram, Propicine T.A.O.	15 U.I.	E	
	Oléandomycine			OL	
	Spiramycine Josamycine Midécamycine	Rovamycine, Spiramycine coquelusedal Josacine Midécacine	100 µg (333 U.I.)	SP	
LINCOSAMIDES	Lincomycine	Lincomine	15 µg	L	
	Clindamycine X	Dalacine	2 U.I.  15 U.I. (anaérobies)	CM  CLI	
STREPTO-GRAMINES	Pristinamycine Virginiamycine	Pyostacine Staphylomycine	15 µg	PT VG	
POLYPEPTIDES	Bacitracine	Bacitracine	10 U.I. (130 µg)	B	
	Polymyxine B Colistine	Polymyxine B Colimycine	300 U.I. (50 µg)	PB CS	
SULFAMIDES et ASSOCIATIONS	Sulfamides (10)	Adiazine, Antébor, Exoseptoplix, Rüfol, Salazopirine	200 µg	SSS	
	Triméthoprim (10)	Wellcoprim	5 µg	TMP	
	Triméthoprim (11)	Antrima, Bactékod, Bactrim, Eusaprim, Supristol	1,25 µg + 23,75 µg	SXT	
	Sulfamides				
NITRO-FURANES	Furanes (10)	Ambatrol, Antinal, Furdantine, Microdoine, Urfadyn	300 µg	FT	

## Résumé

Les actinomycètes sont des bactéries responsables de la production de la plupart des molécules bioactives. L'objectif de cette étude consiste en l'identification de la molécule bioactive élaborée par des actinomycètes.

Un total de 8 souches possédant un pouvoir inhibiteur contre au moins deux bactéries indicatrices est utilisé. Elles ont été isolées à partir des échantillons de différents sols arides de la wilaya d'Al Bayadh et identifiées physiologiquement et biochimiquement comme étant des *Streptomyces*.

L'activité antibactérienne a été testée vis-à-vis de 3 bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, *Bacillus subtilis* ATCC 10870), et 2 bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922). La technique des cylindres d'agar a été utilisée pour la recherche du pouvoir inhibiteur. Les 8 souches ont été cultivées ensuite par fermentation sur milieu solide AF afin de produire des extraits riches en métabolites secondaires. L'extraction a été faite par macération du milieu par le méthanol.

Les résultats obtenus montrent que les 8 souches d'actinomycètes sont actives contre au moins deux bactéries indicatrices. Aucune souche parmi les 8 n'a présenté une activité contre *P. aeruginosa*. L'extrait méthanolique était actif contre les 4 souches testées.

Les spectres UV-Visible des extraits méthanoliques des 8 souches montrent que ce sont des substances non polyniques.

La séparation par chromatographie sur couche mince (CCM) nous a orientés vers le choix du système solvant adéquat, il s'agit d'Acétate d'éthyle- méthanol (6 :4). Il a donné une migration rapide des molécules bioactives avec une bonne séparation.

La bioautographie des 19 taches obtenue par la CCM montre que seulement 6 taches sont actives contre *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

L'analyse par CPG des composés actifs nous a permis de rapprocher de la famille chimique de la molécule bioactive. Les temps de rétention obtenus correspondent à un nombre de substances chimiques à pouvoir antibactérien tel que marinomycine, streptomycine et diethylphthalate.

**Les Mots clés :** Actinomycètes ; molécule bioactive ; sol aride ; activité antibactérienne, spectre UV visible, CCM, bioautographie, CPG.

## ملخص

الأكثينوميستات هي بكتيريا مسؤولة عن إنتاج معظم الجزيئات البيولوجية النشطة حاليا. الهدف من هذه الدراسة هو التعرف على هذه الجزيئات البيولوجية النشطة التي تفرزها الأكثينوميستات.

في عملنا هذا استعملنا ثماني سلالات أكثينوميستات وذلك لقدرتها التثبيطية ضد إثنين من البكتيريا الممرضة و المعزولة من عينات مختلفة من التربة الجافة لولاية البيض و المعرفة من الناحية الفسيولوجية و البيوكيميائية على أنها *Streptomyces*.

نشاط الأكثينوميستات المضاد للبكتيريا كان ضد ثلاثة بكتيريا ايجابية الغرام , *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, *Sataphylococcus aureus* ATCC 25923) و *Bacillus subtilis* ATCC 10870 وإثنين من البكتيريا سلبية الغرام (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922) هذا النشاط تم تحقيقه عن طريق تقنية أسطوانة الأجار , و أظهرت النتائج أن الأكثينوميستات الثمانية كانت نشطة ضد إثنين من البكتيريا الممرضة على الأقل بينما لم تظهر أي نشاط ضد *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

وقد نمت هذه السلالات عن طريق التخمر في وسط انتقائي صلب AF و ذلك من أجل استخلاص المركبات الثانوية . بواسطة الميتانول و قد أظهرت هذه المركبات نشاط و فاعلية ضد أربع بكتيريا ممرضة *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus subtilis* (*Sataphylococcus aureus*).

أظهرت نتائج امتصاص الضوء المرئي و فوق البنفسجي لهذه المستخلصات الخام الميتانولية أنها ذات طبيعة غير بولينية أما فصلها بواسطة CCM فإن نظام المذيبات (أسيتات الأيثيل مع الميتانول) كان الأحسن من بين 6 أنظمة مستعملة.

من بين 19 لطفة التي تحصلنا عليها عن طريق CCM, 6 لطفات فقط كانت نشطة ضد *S. aureus*, و هذا النشاط تم تحقيقه بواسطة تقنية البيوتوغرافيا فصل هذه المستخلصات الخام الميتانولية عن طريق تقنية CPG أكد وجود جزيئات نشطة مضادة للبكتيريا في هذه المستخلصات أهمها : المارينوميستين الستراتوميسين و ثنائي الأيثيل فتالات.

**الكلمات المفتاحية :** الأكثينوميستات , الجزيئات البيولوجية النشطة , تربة جافة , نشاط مضاد للبكتيريا , CCM, البيوتوغرافيا CPG .

## Abstract

The actinomycetes are bacteria responsible for producing most of bioactive molecules. The aim of this study is the identification of the bioactive molecule produced by actinomycetes.

A total of 8 strains with inhibitory effects against at least two indicator bacteria are used. They were isolated from samples of different arid soils of the province of Al Bayadh, physiologically and biochemically identified as *Streptomyces*.

The antibacterial activity was tested against of 3 Gram + bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria monocytogenes* ATCC15313, and *Bacillus subtilis* ATCC 10870) and two-gram negative bacteria (*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC25922). The agar cylinder technique was used to research the inhibitory power. All the 8 strains were cultured on a solid medium by fermentation medium (AF) to produce secondary metabolites. The extraction was made by maceration by methanol.

The results obtained show that the 8 actinomycete strains are active against at least two indicator bacteria. No strain among 8 has shown activity against *P. aeruginosa*. The methanol extract was active against the four strains tested.

The UV-visible spectra of the methanol extracts of 8 strains show that they are not polynic substances.

The separation by thin layer chromatography (TLC) directed us to the choice of the suitable solvent system; it is methanol ethyl acetate (6: 4). He gave a rapid migration of bioactive molecules with good separation.

The 19 tasks bioautography obtained by TLC shows that only six tasks are active against *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.

GC analysis of active compounds allows us to approach the chemical family of the bioactive molecule. The retention times obtained corresponds to a number of chemical substances such as antibacterial marinomycine, streptomycin and diethylphthalate.

**Key words:** Actinomycets, Bioactive molecules, Soil arid, antibacterial activity, UV spectrum visible TLC, Bioautography, CG.