

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de Magister
En Microbiologie Appliquée aux substances antimicrobiennes

THEME :

*Criblage d'actinomycètes productrices
d'antibiotiques et d'antifongiques
à partir de sédiments marins et fluviaux*

Présenté par :

M^{me} YALAOUI née GUELLAL Drifa.

Soutenu le 22 Novembre 2012 devant le jury composé de :

M ^{me} BEDJOU F.	Maitre de conférences A.	(UAM de Bejaïa)	Présidente
Mr KECHA M.	Maitre de conférences A.	(UAM de Bejaïa)	Rapporteur
Mr TOUATI A.	Maitre de conférences A.	(UAM de Bejaïa)	Examineur
Mr NABTI E.	Maitre de conférences A.	(UAM de Bejaïa)	Examineur

2011-2012

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Abderrahmane MIRA de Bejaia
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Mémoire de Magister
En Microbiologie Appliquée aux substances antimicrobiennes

THEME :

*Criblage d'actinomycètes productrices
d'antibiotiques et d'antifongiques
à partir de sédiments marins et fluviaux*

Présenté par :

M^{me} YALAOUI née GUELLAL Drifa.

Soutenu le 22 Novembre 2012 devant le jury composé de :

M ^{me} BEDJOU F.	Maitre de conférences A.	(UAB de Bejaïa)	Présidente
Mr KECHA M.	Maitre de conférences A.	(UAB de Bejaïa)	Rapporteur
Mr TOUATI A.	Maitre de conférences A.	(UAB de Bejaïa)	Examineur
Mr NABTI E.	Maitre de conférences A.	(UAB de Bejaïa)	Examineur

2011-2012

REMERCIEMENTS

Au terme de ce modeste travail je remercie Dieu le tout puissant de m'avoir donné le courage et la patience de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier avant tous mon encadreur Mr KECHA M. qui a accepté de superviser ce travail pour ses conseils, sa disponibilité et son sérieux dans le travail.

Mes sincères considérations et remerciements vont également aux membres du jury : M^{me} BEDJOU F. qui m'a fait l'honneur de présider ce jury, Mr TOUATI A. et Mr NABTI E. qui ont accepté de faire partie de ce jury, d'examiner ce travail et consacrer de leur temps précieux pour l'évaluation de ce modeste travail.

J'adresse mes vifs remerciements au Pr BENALLAOUA S. Responsable du Laboratoire de Biochimie Microbienne pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier chaleureusement le Dr MADANI K. Responsable du Laboratoire d'Analyses Instrumentales pour m'avoir accueilli dans son laboratoire,

Un immense merci à M^{lle} BRAHMI F. (Maitre de Conférences classe A à l'Université de Bejaia) pour son aide, ses conseils et sa disponibilité. Qu'elle veuille bien trouver ici l'expression de ma gratitude et de mon profond respect.

Je tiens à exprimer mes sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé de près ou de loin à ce travail, et qui m'ont appris une infinité de choses et m'ont aidé, conseillé et soutenu de manière continue afin de mener ce travail dans les meilleures conditions.

DEDICACES

Je dédie ce travail à :

Mes parents qui sont toujours présents pour faire mon bonheur. Que Dieu les protège et leur donne longue vie pleine de santé et qu'ils trouvent ici la preuve de ma reconnaissance infinie et d'un profond amour.

Mon mari Nabil d'être toujours à mes côtés pour me soutenir et surtout pour me donner la force pour surmonter tout les obstacles et les difficultés. Si je suis arrivée là, c'est bien grâce à lui. Que Dieu lui donne longue vie et le protège, j'espère qu'il trouve ici le témoignage de mon profond amour, attachement et respect.

Mes poussins Aïmed-eddine et Oualid : ma joie, mon bonheur et ma raison de vivre. Que dieu les bénisses, leur donne longue vie pleine de réussite, de bonheur et de paix,

Ma sœur Nassira, son mari Fateh et ses filles Ranya et Imane.

Mes frères Rezkî, Mohamed, Amar et Seghir, leurs femmes et leurs enfants.

Toute ma famille, ma belle famille, Khemissi, Iyes et leurs familles, que Dieu leurs donne une vie pleine de réussite et de bonheur, ainsi que.

Mes collègues et amies: Youcef, Farhat, Sonia, Faty, Malika, Nabila, Kahina, Habiba, Naima, Lila, Chafika, Lamia, Samia, Samira, Salima, Nouara, Sakina, Dalila, Nassima, Monia et tous le personnel de la FSNV.

Toute ma promotion ; Ilyes, Halim, Yazide, Saadia sans oublier Samir.

En témoignage de ma profonde reconnaissance et respect.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau N°	Titre	Page
1	Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires	12
2	Types pariétaux et types glucidiques cellulaires des actinomycètes aérobies à méso-DAP	13
3	Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes	14
4	Différentes valeurs de GC % rencontrées dans le groupe des Actinomycètes	15
5	Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes	17
6	Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes	18
7	Paramètres physicochimiques des trois échantillons de sédiments	42
8	Type du sol en fonction du taux d'humidité	42
9	Type du sol en fonction de matière organique	43
10	Type de sol en fonction de la conductivité électrique.	43
11	Analyse granulométrique de l'échantillon SS.	43
12	Résultats de l'isolement des actinomycètes à partir des 3 échantillons	44
13	Activité antibactérienne des actinomycètes isolées.	47
14	Caractères cultureux de l'isolat SSB₂ .	49
15	Caractères physiologiques et biochimiques de l'isolat SSB₂	52
16	Résultats de chimiotaxonomie de l'isolat SSB₂	54

LISTE DES FIGURES

Figure N°	Titre	Page
1	Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète	6
2	Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i> .	7
3	Classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S	9
4	Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes	10
5	Mycélium de substrat avec des chaînes de spores de <i>Streptomyces</i> sur le milieu Amidon-Caséine de Williams.	11
6 a	Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons et d'autres bactéries non filamenteuses.	19
6 b	Secteur angulaire montrant la répartition de production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les <i>Streptomyces</i> , les genres apparentés et d'autres genres d'actinomycétales.	19
7	Modes d'action et principaux cibles d'antibiotiques	20
8	Photographie satellitaire de la région où ont été effectués les prélèvements (ville de Bejaia, zone Sidi-Ali lebhar)	25
9	Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar	30
10	Identification présomptive de la souche sélectionnée et purifiée.	31
11	Technique de culture sur lamelle.	33
12	Etapes suivies pour déterminer les acides aminés cellulaires des actinomycètes	38
13	Etapes à suivies pour déterminer les sucres cellulaires des actinomycètes	39
14	Taux d'actinomycètes isolés des sédiments en fonction de la conductivité, du taux de matière organique et du taux d'humidité	45
15	Observation au microscope optique de coloration de Gram de la souche SSB₂	50
16	Observation au microscope optique des lamelles déposées sur des lames de la souche SSB₂	51
17	Observation sous microscopique de <i>Streptomyces sp.</i>	51
18	Variation du pH au cours de la croissance de la souche SSB₂ sur ISP ₂ , ISP ₅ , PELG et M ₂	55
19	Evolution de la biomasse cellulaire de la SSB₂ sur ISP ₂ , ISP ₅ , PELG et M ₂	56

LISTE DES ABREVIATIONS

ATCC: American type culture collection

C.E: Conductivité électrique

DAP: Acide diaminopimélique

E.N.S: Ecole Normale Supérieure

G: Grossissement

GLM: Gélose à l'extrait de levure et de malt

ISP: International *Streptomyces* Project

LMA: Laboratoire de Microbiologie

Appliquée

MA: Mycélium aérien

M₂: Milieu Williams

M₃: Milieu Williams modifié

ND: Non déterminé

NRRL: Northern Regional Research

Center, USA

PC: Phosphatidylcholine

PE: Phosphatidylétanolamine

SARM: *Staphylococcus aureus*
multirésistante

SM: Sédiment de la plage de Sidi Ali
lebhar.

SE: Sédiment de l'embouchure de l'Oued
Soummam.

SS: Sédiment de l'Oued Soummam.

q.s.p : Quantité suffisante pour

Remerciements	
Dédicaces	
Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	

Sommaire

Introduction	1
Partie I: Synthèse Bibliographique	
Chapitre I : Les actinomycètes	3
I-1- Définition et caractères généraux.....	3
I-2- Ecologie.....	3
I-3- Biologie du développement.....	5
I-3-1- Mycélium du substrat et Mycélium aérien.....	5
I-3-2- Formation des spores.....	6
I-3-3- La germination des spores.....	7
I-4- Taxonomie.....	7
I-4-1-Taxonomie phénétique.....	8
I-4-2- Chimiotaxonomie.....	11
I-4-3-Taxonomie moléculaire.....	14
Chapitre II : Les antibiotiques produits par les actinomycètes	16
II-1- Généralités.....	16
II-2- Mode d'action des antibiotiques.....	20
II-2-1-Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.....	20
II-2-2-Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	21
II-2-3-Antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques et de leurs précurseurs.....	21
II-3-Facteurs influençant la production d'antibiotiques chez les actinomycètes.....	22
II-3-1-Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques.....	22
II-3-2-Effet du pH, de la température et du temps d'incubation.....	23

Partie II: Partie Expérimentale

A-Isolement des actinomycètes et mise en évidence de l'activité antimicrobienne (criblage)

I-Prélèvement des échantillons.....	25
II- Caractéristiques physicochimique des échantillons.....	26
II-1- Mesure du pH	26
II-2- Mesure de la conductivité de l'extrait aqueux	26
II-3- Détermination du taux humidité.....	26
II-4- Détermination du taux de matière organique.....	26
II-5- Analyse granulométrique de l'échantillon.....	27
III- Isolement, purification et conservation des actinomycètes.....	28
IV- Recherche de l'activité antimicrobienne.....	28
IV-1- Recherche de l'activité antibactérienne.....	28
IV-2- Recherche de l'activité antifongique.....	31

B-Identification morphologique, physiologique biochimique chimiotaxonomique de la souche sélectionnée

I-Préparation de l'inoculum de la souche sélectionnée.....	32
II- Etude morphologique.....	32
II-1-Caractères cultureux.....	32
II-2-Aspect microscopique.....	32
III- Etude physiologique.....	33
III-1-Détermination des pigments mélanoides et des pigments diffusibles.....	33
III-2-Hydrolyse de l'amidon.....	34
III-3-Hydrolyse de la caséine.....	34
III-4-Dégradation des glucides et dérivés.....	34
III-5-Sensibilité aux antibiotiques	34
III-6-Croissance à différentes températures.....	35
III-7-Croissance à différents pH.....	35
IV- Etude biochimique.....	35
IV-1-Recherche de l'Uréase.....	35
IV-2-Recherche de la production d'Indole.....	35
IV-3-Recherche de la Nitrate-Réductase.....	35
IV-4-Utilisation du citrate comme source de carbone.....	36

IV-5-Détermination de la mobilité.....	36
V- Etude chimiotaxonomique.....	36
V-1-Obtention du mycélium.....	36
V-2-Détermination des acides aminés des cellules entières.....	37
V-3-Détermination des sucres.....	37
VI- Suivi de la croissance de la souche sélectionnée sur des milieux liquide.....	40
VI-1-Préparation de la préculture.....	40
VI-2- Essai de culture en discontinue	40

Résultats et discussion

A-Isolement des actinomycètes et mise en évidence de l'activité antimicrobienne (criblage)

I-Caractéristiques physicochimique des échantillons.....	42
II- Isolement, purification et conservation des actinomycètes.....	44
III- Criblage des actinomycètes productrice d'antibiotiques.....	45

B-Identification morphologique, physiologique, biochimique et chimiotaxonomique de la souche sélectionnée

I-Etude morphologique.....	49
II-Etudes physiologique et biochimique.....	52
III- Etude chimio-taxonomique.....	54
IV-Suivi de la croissance de la souche sélectionnée sur des milieux liquide.....	55

Conclusion	61
-------------------------	----

Références bibliographiques	63
--	----

Annexes	75
----------------------	----

Introduction

L'usage, fréquemment abusif, des antibiotiques est responsable de l'évolution de la résistance bactérienne avec, pour conséquence, une augmentation du nombre d'échecs thérapeutiques (**Courvalin et Trieu-Cuot, 1990; Genné et Siegrist, 2003**).

Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé selon **Kitouni, (2007)** que soit par :

- L'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées.
- La réalisation de nouvelles molécules semisynthétiques à partir de structures connues 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.

Pour ces trois approches, les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production d'antibiotiques notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces*. D'ailleurs, plus de la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement sont produits par ces bactéries filamenteuses telluriques (**Breton et al., 1989**).

De nombreuses recherches ont été menées afin de mettre en évidence la présence de microorganismes (bactéries, virus, champignons, etc.) au niveau des sédiments marins (**Whitman et al., 1998; Roussel et al., 2008**). D'après **Kallmeyer et al. (2009)**, ces derniers hébergerait de 5 à 15 % de la biomasse microbienne sur Terre. Ces micro-organismes parmi eux les actinomycètes (**Anzai et al., 2008; Suthindhiran et al., 2009**) sont soumis à des conditions extrêmes en termes de température, pression, nutriments et énergie disponible (**Duthoit, 2010**).

Dans cette optique, l'objectif principal de notre étude consiste en l'isolement de souches d'actinomycètes productrices de substances à activité antibactérienne à partir d'écosystèmes inhabituels (sédiments marins et fluviaux).

La première partie de ce document porte sur une synthèse bibliographique : généralités sur les actinomycètes et un aperçu sur les antibiotiques produits par les actinomycètes.

➤ La deuxième partie (expérimentale) concerne les différents matériels et méthodes utilisés en vue:

- ✓ D'isoler de souches d'actinomycètes à partir d'écosystèmes inhabituels (sédiments marins et fluviaux) ;
- ✓ De sélectionner les souches productrices d'antibactériens et de mettre en évidence de cette activité. Et en fonction des résultats de ce criblage de base ;
- ✓ D'identifier les souches sélectionnées par l'étude des caractères morphologiques, physiologiques, biochimiques et chimio-taxonomique.

Dans cette partie la présentation des résultats obtenus ainsi que leur discussion ont été également réalisés

Ensuite nous avons donné des conclusions relatives aux différents résultats obtenus et nous avons terminé par la liste des références bibliographiques utilisée dans le manuscrit.

Partie I

Synthèse Bibliographique

I- Les actinomycètes

I-1- Définition et caractères généraux

Les actinomycètes sont des bactéries dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires (**Eunice et Prosser, 1983**) constituées d'hyphes, c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973**).

Les actinomycètes se situent dans le phylum *Actinobacteria*, l'ordre des *Actinomycetales* (**Mariat et Sebald, 1990**), ce sont des procaryotes à structure de bactéries à Gram positif (**Sanglier et Trujillo, 1997**) dont le coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55 %, (généralement compris entre 60 et 75 %) formant des colonies à morphologie complexe (**Ensign, 1978**).

Elles comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets où rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Les formes évoluées possèdent un mycélium du substrat (nourricier), surmonté par un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression « ray fungi » ou « champignons rayonnants » (**Lamari, 2006**).

I-2- Ecologie

Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires rencontrés sur tous les substrats naturels courants (**Lacey, 1973 ; Porter, 1971**). Ils représentent le groupe de microorganismes le plus largement distribué dans la nature (**Oskay et al., 2004 ; Singh et al., 2006; Narayana et al.,2008**).

Bien que les premières souches d'actinomycètes ont été isolées de sources humaines et animales respectivement par **Cohn** en **1875** et **Nocard** en **1888**, c'est le sol qui en est certainement le réservoir le plus riche, réservoir à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes tels que :

- Les sols

Les actinomycètes sont largement répandus dans tous les sols à l'exception des sites exposés à des conditions 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 tels que

la géosmine et le 2-méthyl isobornéol (MIB) qui sont responsables de l'odeur d'humus caractéristique des sols (**Omura, 1992 ; Zaitlin et al., 2003**).

Leur nombre varie dans de fortes proportions selon les cas mais il est courant dans des terres fertiles de dénombrer 10^6 unités formants colonies par gramme de terre sèche. 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 (**Omura, 1992 ; Zaitlin et al., 2003**).

- Les milieux marins

Certaines souches d'actinomycètes ont été retrouvées dans des environnements marins (**Singh et al., 2006 ; Imada et al., 2007**). Selon les uns, les souches d'actinomycètes isolées de tels milieux ne seraient que des formes terricoles adaptées à la salinité de l'eau de mer ; selon d'autres, il existerait bien une flore d'actinomycètes propre aux sédiments marins caractérisée par sa barotolérance, son halophilie et une température optimale faible (**Larpen et Sanglier, 1989 ; Theilleux, 1993 ; Okasaki, 2006**).

Cependant, en 2002, **Mincer et al.**, ont isolé des souches d'actinomycétales à partir du milieu marin, nécessitant de l'eau de mer pour leur croissance, et ces souches ont été désignées comme actinomycètes marines.

En effet, un grand nombre d'actinomycètes ont été isolés de la mer profonde, un environnement à forte pression, à basse température, à concentration variable d'oxygène et de sel avec absence de lumière, preuve d'une vaste distribution de ces groupes de part le monde (**Pizzul, 2006**).

- Les eaux douces

Les actinomycètes sont bien représentés dans ce milieu d'où peuvent être facilement isolés des souches de *Micromonospora*, d'*Actinoplanes* et de *Streptosporangium*. C'est essentiellement dans des sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre et sa flaveur (**Zermane, 2008**).

- Air

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat, mais un moyen de transport (**Gazenko et al., 1998 ; Reponen et al., 1998 ; Suutari et al., 2002**).

-Les composts

Des actinomycètes ont été isolés des composts, il s'agit de genres thermophiles tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et d'autres thermotolérants tels que *Microbispora*, *Micropolyspora*, *Pseudonocardia*. Les actinomycètes 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).

- 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 plus 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.

I-3- Biologie du 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 (Chater et Merrick, 1979).

Ainsi, les actinomycètes les plus différenciés développent sur un milieu gélosé une masse d'hyphes mycéliens répartis en deux couches distinctes : 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).

I-3-1- Mycélium du substrat et mycélium aérien

Le mycélium du substrat, également, dénommé mycélium végétatif ou primaire se développe à partir du tube de germination issu de la spore (Figure N°1).

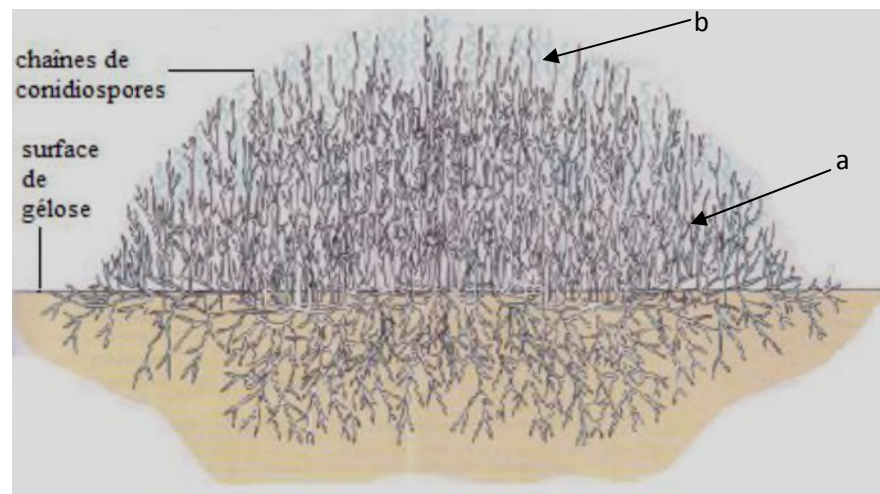


Figure N°1 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète (**Prescott et al., 2003**).

a : les hyphes vivants (bleus-verts), b : les hyphes morts (blancs).

Le mycélium du substrat est ancré dans le support solide où il puise ses nutriments. Sa croissance, de type apicale, est analogue à celle observée en milieu liquide.

Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. 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 (**Chater et Merrick, 1979**).

I-3-2- 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 (**Leveau et Buix, 1993**).

-Les exospores sont le type le plus fréquent, elles sont formées par septation d'hyphes existants et séparation des éléments obtenus.

-Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles, elles sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphes existant.

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-3-3- Germination des spores

A l'issue d'une dormance dont la durée est fonction du type et des conditions du milieu, les spores germent pour donner naissance à un mycélium.

Quatre étapes sont distinguées: l'activation, l'initiation, l'émergence du tube de germination et la croissance de celui-ci (Figure N°2).

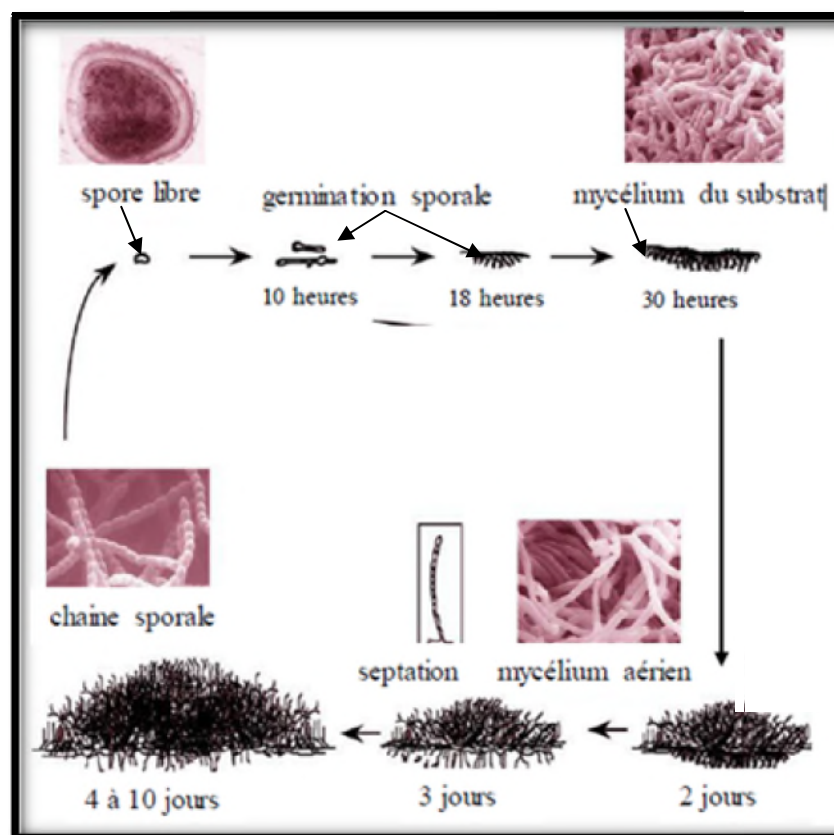


Figure N°2 : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002).

I-4- Taxonomie

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

Selon la classification du « Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology », (**Garrity et al., 2007**), le phylum *Actinobacteria* (bactérie Gram positif et à G+C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également « *Actinobacteria* ».

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes (Figure N°3) (**Garrity et al., 2007**): *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Actinobacteridae*.

I-4-1-Taxonomie phénétique

Les caractères morphologiques principalement utilisés dans la classification des actinomycètes sont (**Schofield et Schaal, 1981 ; Demain et Solomon, 1985**) :

-La présence, l'importance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien.

-La présence de spores, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes, leur nombre, leur forme et leurs surface (lisses, rugueuse, épineuses chevelues).

-La présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou synnemata

-Les chaînes de spores peuvent être droites à flexueuses (type RF= *Rectus Flexibilis*), en crochets ou en boucles fermées (Type RA= *Retinaculum Apertum*) ou encore spirales (Type S= *Spira*).

Mais bien qu'il soit parfois possible de classer une souche sur la base de critères morphologiques tout à fait évident, ceux-ci ne suffisent pas pour établir une détermination correcte et il est indispensable de considérer d'autres caractères (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

La micromorphologie de quelques genres principaux est schématisée dans la figure N°4, et des observations microscopiques du genre *Streptomyces* sont présentées dans la figure N°5.

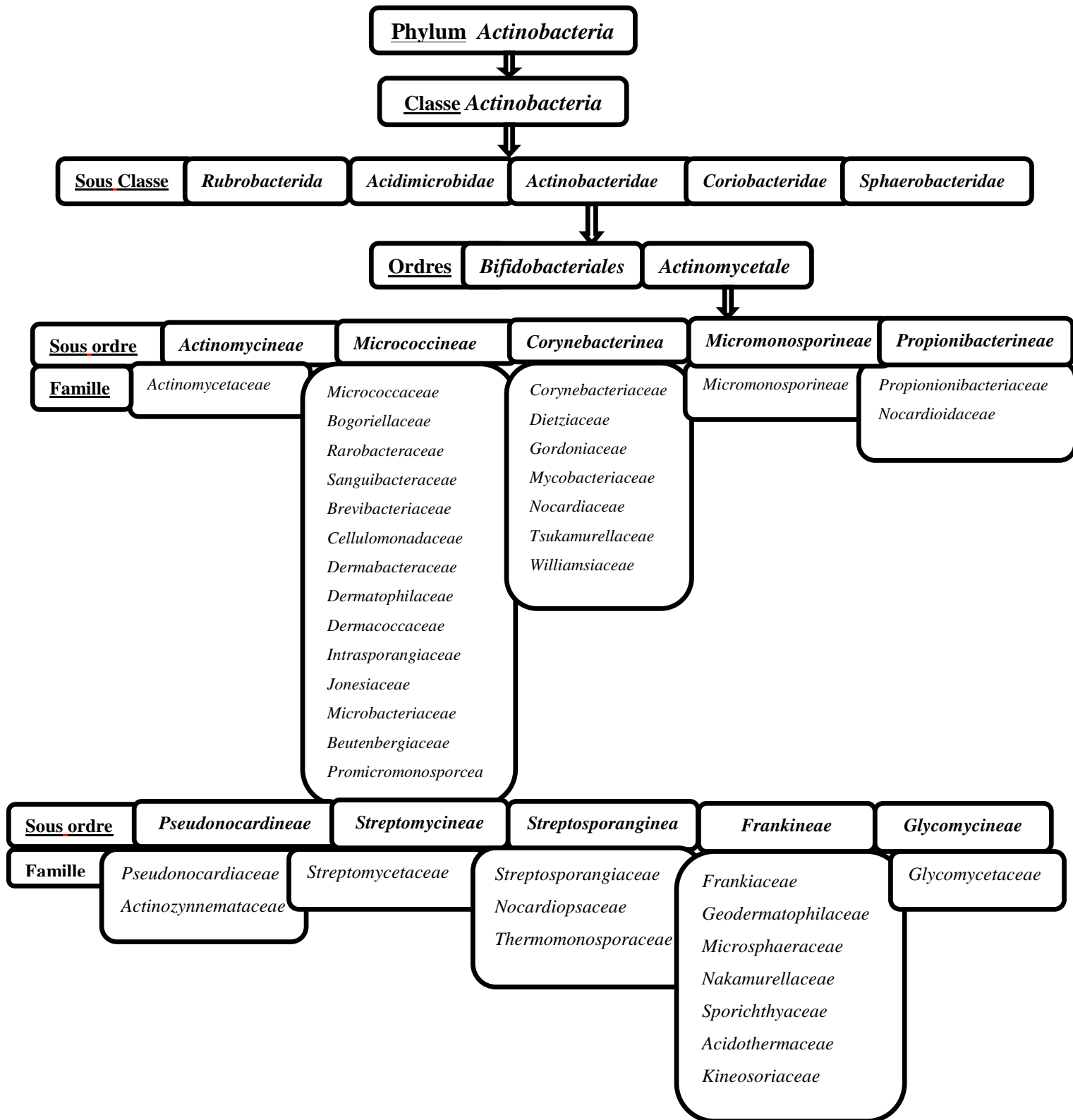


Figure N°3: Classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / l'ARNr 16S (Garrity et al., 2007).

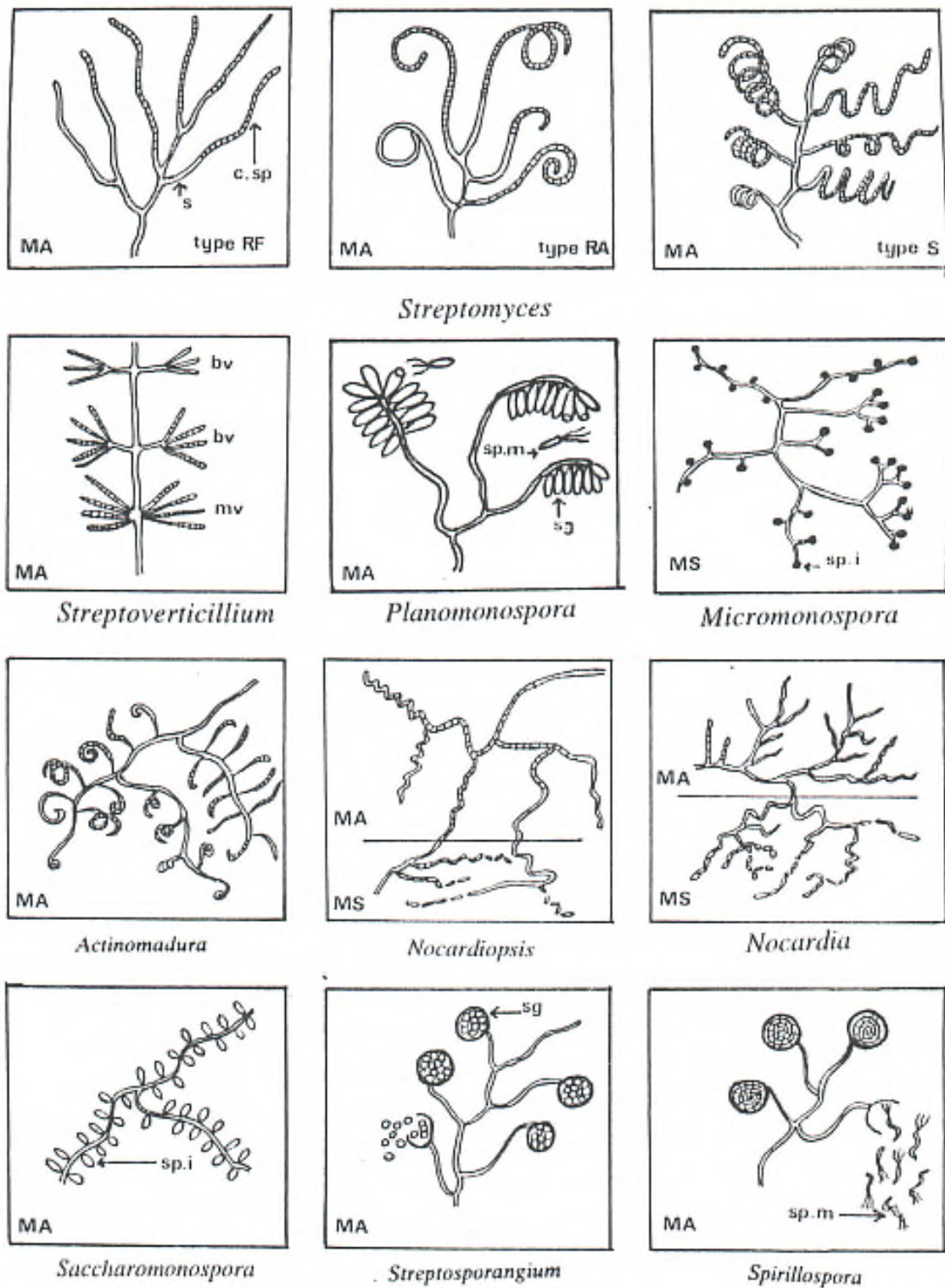


Figure N°4: Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes in : (Zitouni, 2005).

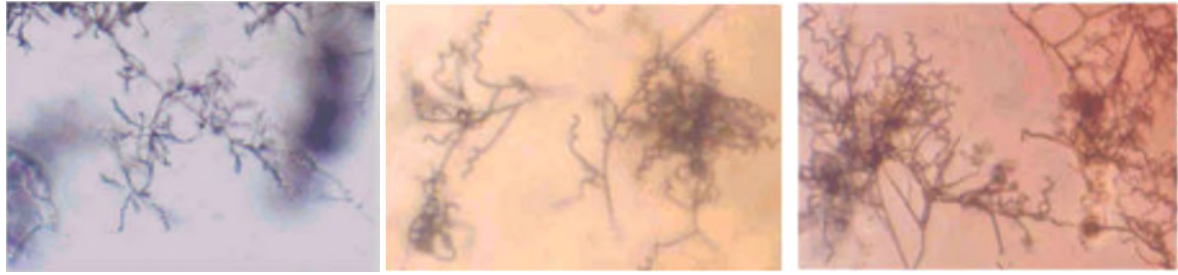


Figure N°5 : Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de *Streptomyces* sur le milieu Amidon-Caséine de Williams (**Srivibool et Sukchotiratana, 2004**).

I-4-2- Chimiotaxonomie

L'étude des constituants majeurs de la paroi cellulaire des actinomycètes constitue un outil pratique pour leur taxonomie (**Stanek et Roberts, 1974 ; Lechevalier et al., 1977**), elle permet de répartir ces microorganismes en huit types.

➤ Les amino-acides

La paroi cellulaire des actinomycètes est composée soit d'une :

-glycoprotéine contenant de la lysine ; ce type de paroi est rencontré chez les formes fermentatives, habitants naturels des cavités de l'Homme et des animaux, illustrées par le genre *Actinomyces* (**Lechevalier et Lechevalier, 1985**).

-glycoprotéine contenant le plus souvent l'acide LL- 2,6 diaminopimélique (DAP) ; ce type de paroi se rencontre chez les formes oxydatives retrouvées essentiellement dans le sol, telles que les *Streptomyces*.

Les actinomycètes avec des parois cellulaires de type I possèdent principalement de l'acide diaminopimélique de forme LL, cependant que la forme méso de ce même acide est caractéristique des types II, III et IV (Tableau N°1).

La glycine est également présente en quantité importante chez les *Streptomyces* et les *Actinoplanetes* (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Tableau N°1 : Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

Type pariétal	Constituants distinctifs majeurs	Exemples de genres
I	LL-DAP, glycine	<i>Streptomyces</i>
II	méso-DAP, glycine, arabinose, xylose	<i>Micromonospora</i> ,
III	méso-DAP, madurose, galactose, rhamnose	<i>Actinomadura</i>
IV	méso DAP, arabinose ,galactose	<i>Nocardia</i>
V	lysine, ornithine	<i>Actinomyces (israelii)</i>
VI	lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	ornithine	<i>Cellulomonas</i>

DAP : acide diaminopimélique, **DAB** : acide diaminobutyrique

Toutes les parois contiennent les molécules suivantes: glucosamine, acide muramique, alanine, acide glutamique.

➤ Les sucres

La présence ou l'absence de quatre sucres (arabinose, galactose, xylose et madurose) dans les hydrolysats acides de cellules entières permet de classer les actinomycètes de type pariétal II, III et IV contenant du méso-DAP (tableau N°2). Sur cette même base, il est aussi possible de répartir en deux sous-groupes les actinomycètes de type pariétal III selon la présence ou l'absence de Madurose (**Lechevalier et Gerber, 1970**).

➤ Les lipides

Les lipides taxonomiquement important peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires, les ménaquinone et les acides mycoliques.

-Les lipides polaires: les plus communs chez les actinomycètes sont les phospholipides d'origine membranaire (**Lechevalier et Lechevalier, 1980**).

Lechevalier et al. (1977) ont distingué 5 types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes qui sont présentés dans le tableau N°3. L'analyse de ces composés a permis de distinguer plusieurs genres entres eux ayant la même morphologie et le même type pariétal (composition en acides aminés et sucres), tels que *Pseudonocardia* et *Amycolatopsis* (**Lechevalier et al., 1986**).

Tableau N°2 : Types pariétaux et types glucidiques cellulaires des actinomycètes aérobies à méso-DAP (Lechevalier et Lechevalier, 1980 ; Parker, 2000).

Type pariétal	Constituants pariétaux distinctifs majeurs	Type glucidique cellulaire (Spectre glucidique)	Constituants glucidiques caractéristiques	Genres représentatifs
II	Glycine	D	Xylose, Arabinose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>
III	Aucun	B	Madurose	<i>Actinomadura</i> , <i>Dermatophilus</i> , <i>Streptosporangium</i>
		C	Aucun ou Rhamnose	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Thermoactinomyces</i> , <i>Streptomyces</i>
IV	Arabinose, galactose	A	Arabinose, galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>

-Les ménaquinones : les ménaquinones sont des lipides ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carboné aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collin et al., 1977). Par exemple, le genre *Planomonospora* se caractérise par une ménaquinone **MK9 (H2)** : ménaquinone avec neuf unités isoprènes dont deux hydrogénées.

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

-Les acides gras : sont des chaînes qui peuvent être droites ou ramifiées, saturées ou insaturées. Les types d'acides gras et leurs pourcentages sont caractéristiques de plusieurs genres. Les acides gras rencontrés chez les actinomycètes sont soit des molécules de 12 à 20 atomes de carbone (Kroppenstedt et al., 1990 ; Grund et Kroppenstedt, 1990 ; Rainy et al., 1996). soit un groupe d'acides mycoliques qui sont des acides gras pariétaux complexes, insaturés, contenant 20 à 90 atomes de carbone, caractéristique des genres tels que *Mycobacterium*, *Nocardia* et *Rhodococcus* (Mordarska et al., 1972).

Tableau N°3: Types de phospholipides rencontrés chez les actinomycètes (**Lechevalier et al., 1977**).

Types de phospholipides	Phosphatidyl éthanolamine (PE)	Phosphatidyl Choline (PC)	Phospholipides avec glucosamine (PG)	Phosphatidyl glycérol
PI	-	-	-	V
PII	+	-	-	-
PIII	-	+	-	V
PIV	+	-	+	-
PV	-	-	+	+

Note : tous les actinomycètes possèdent le phosphatidyl inositol, (+) : présent, (-) : absent, **V**: variable suivant les espèces d'un même genre.

I-4-3-Taxonomie moléculaire

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 réplication de l'ADN est de 50 à 65 minute (diffère d'une espèce à autre) (**Larpen et al., 1989**). Les genres d'actinomycètes peuvent être définies par l'étude du coefficient de Chargaff ou GC % (Tableau N°4), qui représente le nombre de paires de base Guanine Cytosine pour 100 paires de base dans l'ADN, les espèces ne sont pas identifiées par cette technique.

La détermination du coefficient de Chargaff a permis de reconsidérer la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55% (**Goodfellow, 1985**).

Le séquençage de l'ADN ribosomique permet de différencier nettement les genres entre eux. Une espèce d'actinomycètes est définie phylogénétiquement comme l'ensemble des souches ayant des valeurs d'hybridations ADN/ADN supérieures ou égales à 70% (**Devereux et al., 1990**). Les techniques d'hybridations ont également été appliquées à l'hybridation ADN/ARN (**Badji, 2006**).

L'hybridation ADN/ARN a été employée pour placer les procaryotes dans un rang hiérarchique supérieur à l'espèce. Elles ont permis de dégager le concept de superfamille, terme proposé par **De Ley** pour rassembler des taxons à un niveau supragénérique (**Badji, 2006**).

Tableau N°4 : Différentes valeurs de GC % rencontrées chez les Actinomycètes (**Williams et al., 1989**).

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

Les hybridations ADN-ARNr ont été remplacées par le séquençage du gène d'ADNr 16S. Cette méthode a été employée entre autres par **Witt** et **Stackebrandt** en 1990 pour unifier le genre *Streptoverticillium* avec le genre *Streptomyces* et par **Labeda** pour la systématique des *Streptomyces* en 1992 (**Kitouni, 2007**).

II- Les antibiotiques produits par les actinomycètes

II-1- Généralités

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires (**Williams et al., 1993; Lopes et al., 1999 ; Katsifas et al., 1999**).

Les tableaux N° 5 et 6 illustrent quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les actinomycètes.

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

Les actinomycètes sont également la source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine, rebeccamycine, mitomycine), insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinotricine) et de substances ayant des activités immunosuppressive et immunostimulantes (la rapamycine et le FK500) (**Chun et al., 1997 ; Sanglier et Trujillo, 1997 ; Moore et al., 1999 ; Petrosyan et al., 2003**).

Néanmoins, les actinomycètes sont surtout importants du fait qu'ils sont à l'origine de nombreux antibiotiques. Parmi les 25 000 antibiotiques actuellement décrits, environ 70% sont synthétisés par les microorganismes, dont 60% par les actinomycètes (**Leclerc et al., 1986**). Il est à noter que parmi les actinomycètes, le genre *Streptomyces* est la source la plus importante d'antibiotiques (**Okami et Hotta, 1988 ; Long et Wildman, 1993 ; Sanchez, 1996 ; Hwang et al., 2001**).

Tableau N° 5 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes (Loucif ,2011).

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

Tableau N° 6 : Quelques exemples de molécules bioactives non antibactériennes et non antifongiques produites par les actinomycètes (Loucif ,2011).

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

Les figures N° 6 a et 6 b représentent respectivement la répartition de production d'antibiotiques entre les bactéries et les champignons, et celles des molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et autres genres d'actinomycètes dont la dominance de production est affectée aux bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

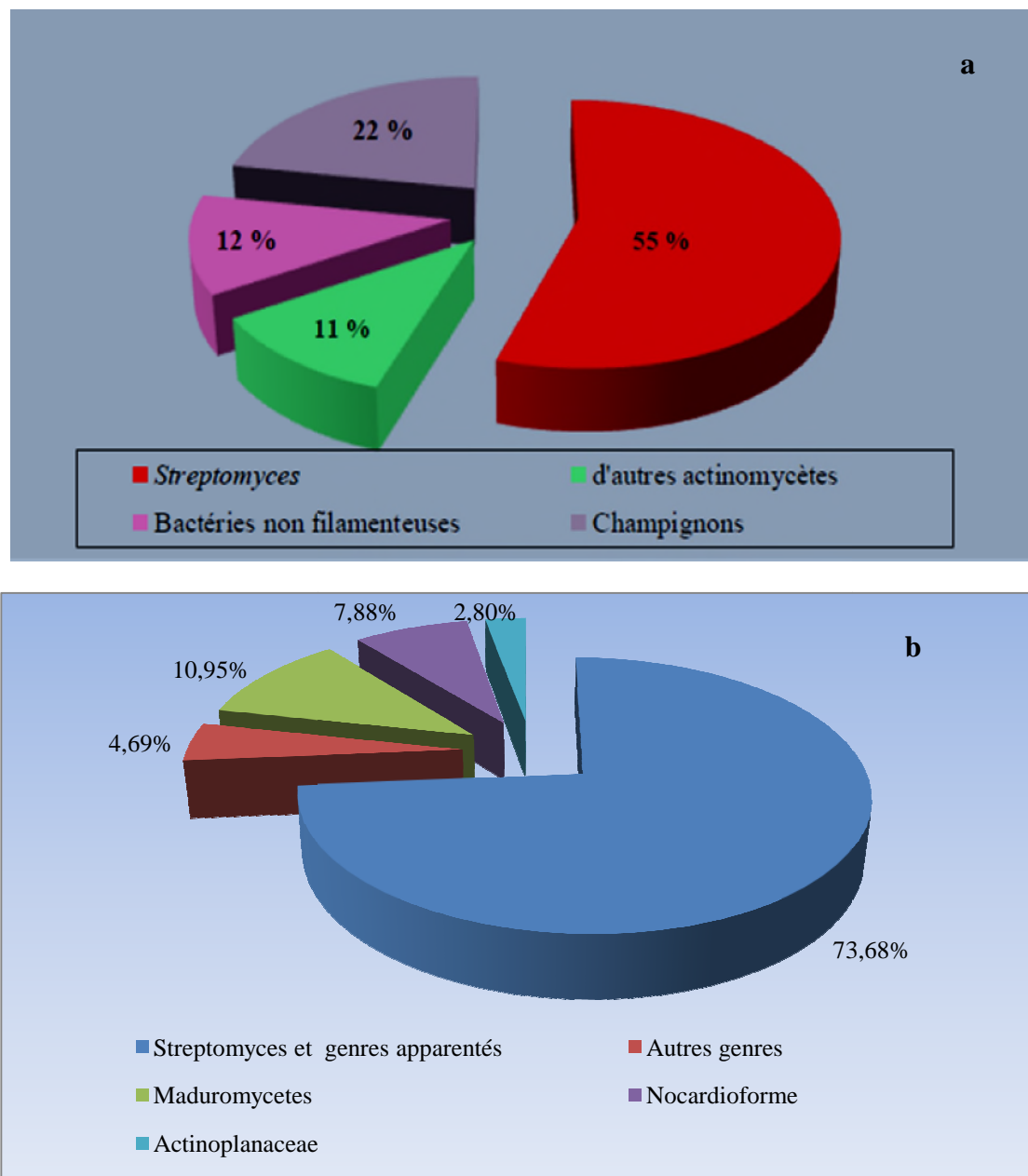


Figure N°6: a: Répartition de la production des antibiotiques entre les actinomycètes, les champignons et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005).

b : Répartition de la production de molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et les genres apparentés d'une part et d'autres genres d'actinomycétales (Sanguilier et trujilo, 1997).

II-2- Mode 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 (figure N°7).

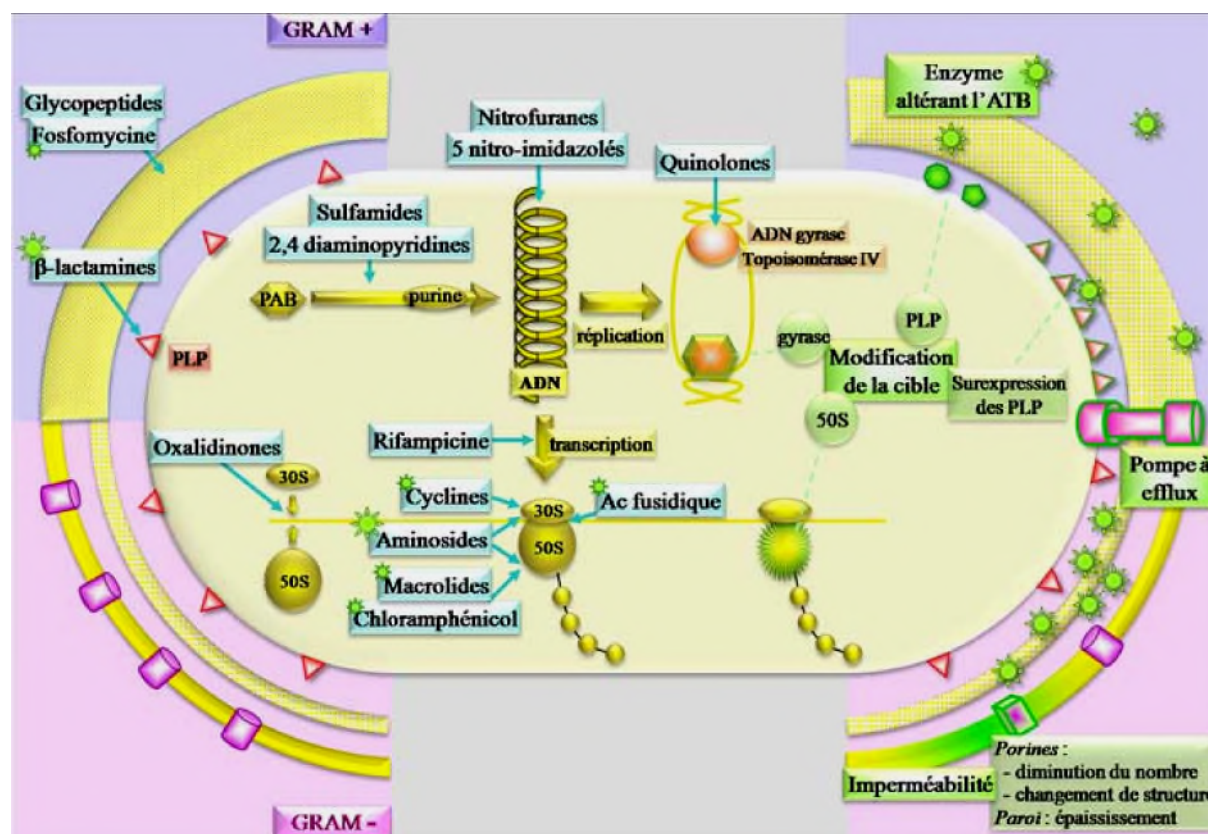


Figure N° 7 : Modes d'action et principaux cibles d'antibiotiques (*memobio*, 2012).

Les antibiotiques agissent différemment vis-à-vis des microorganismes:

II-2- 1-Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

La synthèse de la paroi bactérienne comporte trois étapes successives : **la première** qui se passe à l'intérieur de la bactérie, consiste en la formation des unités de base, l'UDP-N-acéthyl-glucosamine et l'UDP-N-acéthylmuramyl-pentapeptide. **La deuxième** étape permet le passage par un système de transporteurs lipidiques à travers la membrane cytoplasmique de ces deux précurseurs et leur addition pour former une molécule de disaccharide-pentapeptide.

Au cours de **la troisième** étape, cette molécule s'intègre au peptidoglycane préexistant et, à ce stade, deux enzymes essentielles interviennent : une transglycosylase (**Smaoui, 2010**).

Chacune de ces trois étapes peut être perturbée par l'action des antibiotiques. Par exemple, les β -lactames inhibent la dernière étape de la synthèse du peptidoglycane.

II-2- 2-Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Plusieurs antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes et la biosynthèse des protéines des microorganismes. Dans cette classe on peut citer (**Smaoui, 2010**):

- ❖ **Les phénicol**s, ils inhibent l'élongation de la chaîne peptidique ce qui arrête le mouvement des ribosomes le long de l'ARN messager.
- ❖ **Les tétracyclines**, la conséquence est l'arrêt de la fixation du nouvel aminoacyl-tRNA sur le ribosome et un arrêt de l'élongation des chaînes peptidiques.
- ❖ **L'acide fusidique**, bloque l'adjonction d'un nouvel acide aminé dans la chaîne peptidique en formation (blocage de la translocation).
- ❖ **Les aminosides** agissent sur divers métabolismes cellulaires dont la synthèse des protéines. Ils pénètrent dans le cytoplasme par un mécanisme actif nécessitant de l'énergie (systèmes de transporteurs d'électrons et ATP). Ces antibiotiques sont des inhibiteurs de la traduction. En effet, ils provoquent des erreurs de lecture du message porté par l'ARN messager ce qui engendre plusieurs perturbations : altération fonctionnelle de la membrane cytoplasmique, blocage des systèmes de sécrétion et de respiration, etc.
- ❖ **Les macrolides** inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome. Les macrolides empêchent la translocation et par suite l'incorporation des aminoacides.

II-2-3- Antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques et de leurs précurseurs

Dans cette classe, il existe deux groupes d'antibiotiques. Dans le premier groupe on peut distinguer (**Smaoui, 2010**) :

- ❖ **Les quinolones** qui agissent sur les enzymes réglant la conformation de l'ADN telque les topoisomérases (essentiellement l'ADN gyrase). L'arrêt de l'activité de ces enzymes bloque tout changement de conformation et toute synthèse d'ADN.
- ❖ **Les nitroimidazoles** sont des antibiotiques limités aux bactéries anaérobies. La condition nécessaire à l'activité de ces antibiotiques est la réduction partielle de leurs groupements NO_2 .

Les dérivés réduits se fixent sur l'ADN, notamment au niveau des régions riches en adénine et en thymine, provoquant ainsi des coupures des brins et le déroulement de l'ADN (**Le Minor et Veron, 1989**).

❖ **Les nitrofuranes** nécessitent la réduction préalable du groupement NO₂ pour leur action. Cette réduction est réalisée par les nitroréductases des bactéries aérobies. Les dérivés réduits réagissent de façon électrostatique avec l'ADN, provoquant ainsi des coupures, substitutions de bases et même un effet mutagène.

Le deuxième groupe d'antibiotiques agit sur les précurseurs de synthèse des acides nucléiques qui sont les folates. Ces derniers et en particulier l'acide tétrahydrofolique joue un rôle essentiel dans la synthèse des bases puriques et pyrimidiques. Pour ce deuxième groupe, on peut citer les sulfamides et les 2-4-diaminopyrimidines (**Smaoui, 2010**).

II-3- Facteurs influençant 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- Influence des sources nutritionnelles sur la production des antibiotiques par les actinomycètes

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

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

II-3-1-1-Influence des sources carbonées sur la production des antibiotiques

Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, une source de carbone rapidement assimilable exerce une action négative sur la biosynthèse (répression catabolique ou « effet glucose») (**Larpen et Larpen-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, dextrans) 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-3-1-2- Influence des sources azotées sur la production des antibiotiques

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures influe sur les rendements. Les ions ammonium exercent un effet négatif sur la production d'antibiotiques chez les actinomycètes, cela se traduit par un effet de la concentration d'un substrat naturel approprié ou sous forme d'acides aminés lentement métabolisés (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1990**).

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

Si la croissance des micro-organismes réclame des concentrations en phosphate variant 0,3 et 300 M, la synthèse de très nombreux métabolites secondaires est inhibée par des concentrations trop élevées (**Larpen et Larpen-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-3-2- Effet du pH, de la température et du temps d'incubation

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

Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de

l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline tandis qu'un pH basique favorise la sécrétion de tétracycline (**Asanza-Ternuel et al., 1977**).

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**).

Partie II

Partie Expérimentale

Matériel et méthodes

A-Isolement des actinomycètes et mise en évidence de l'activité antimicrobienne (criblage)

I-Prélèvement des échantillons

Les sédiments marins ont été recueillis au niveau d'une plage (SM, coordonnées GPS : 36°43'05.09" N, 4°04'49.34" E élevé 0 m), de l'embouchure de l'Oued Soummam (SE, coordonnées GPS : 36°43'46.18" N, 4°04'36.13" E élevé 2 m) et du lit de l'Oued Soummam (SS, coordonnées GPS : 36°43'58.89" N, 4°04'04.47" E élevé 4 m), de la région de Sidi Ali lebhar à la périphérie de la ville de Bejaia (figure N°8). Ils ont été prélevés à l'aide d'un carottier stérile à une profondeur d'environ de 60cm, puis transporté rapidement au laboratoire de biochimie microbienne de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie de l'Université de A/Mira de Bejaia.



Figure N°8: Photographie satellitaire de la région où ont été effectués les prélèvements (ville de Bejaia, zone Sidi-Ali lebhar), (Google earth, 2009).

Les sédiments ont été récupérés la fin du mois du Février 2012 au niveau des points suivants :

- SM : plage ou zone littorale de la région de Sidi Ali lebhar (Point 3).
- SE : embouchure de l'Oued Soummam (Point 2).
- SS : lit de l'Oued Soummam (Point 1).

II- Caractéristiques physicochimiques des échantillons

II-1- pH des échantillons

Peser 10 g de terre fine séchée à l'air libre, ajouter 25 ml d'eau distillée bouillie et refroidie. Agiter la suspension pendant quelques minutes, laisser reposer quelques minutes et agiter de nouveau durant une minute

-Mesurer le pH de la suspension à l'aide d'un pH-mètre selon la technique de **Pochon et Tardieux (1962)**.

II-2- Mesure de la conductivité de l'extrait aqueux

Vingt grammes (20 g) de sédiments tamisées dans un tamis de 2 mm sont mis en suspension dans 100 ml d'eau distillée. Après une heure d'agitation dans un agitateur rotatif suivie d'une demi-heure de repos. La suspension est ensuite décantée dans un bécher et la conductivité est mesurée à l'aide d'un conductimètre (HANNA) (**Lee et Hwang, 2002**).

II-3- Détermination du taux d'humidité

Cinq à dix grammes de sédiment sont séchés pendant 2 jours dans une étuve à 105°C, jusqu'à obtention d'un poids constant (**Lee et Hwang, 2002**). Le pourcentage d'humidité est calculé d'après la relation :

$$H = \frac{PH - PS}{PH} \times 100$$

Où :

H : Humidité en pourcentage (%).

PH : Poids humide de l'échantillon.

PS : Poids sec de l'échantillon.

II-4- Détermination du taux de matière organique

Après mesure de l'humidité, le sol de chaque échantillon est incinéré pendant 16 heures dans un four à moufle à 450°C. Le taux de matière organique est la différence entre le poids sec et le poids des cendres (**Lee et Hwang, 2002**).

II-5- Analyse granulométrique de l'échantillon

II-5-1-Destruction de la matière organique.

Peser 10 g de terre séchée à l'air libre et les placer dans un bécher de 500 ml ; ajouter 50 ml d'eau oxygénée à 20 volumes et commencer la destruction de la matière organique à froid. Porter sur bain de sable en couvrant le bécher avec un verre de montre. Renouveler les additions d'eau oxygénée jusqu'à destruction totale de la matière organique. La réaction est terminée quand toute la mousse a disparu.

II-5-2-Dispersion.

Transvaser le contenu du bécher dans un flacon d'un litre, ajouter de l'eau distillée sans dépasser le volume de 500 ml et ajouter aussi 25 ml de la solution de pyrophosphate de sodium à 40g/L. Agiter deux heures à l'agitateur rotatif à allure modérée. Amener la suspension à 1 litre avec de l'eau distillée après l'avoir transvasée dans une allonge de sédimentation. Agiter énergiquement cette dernière.

II-5-3-Détermination des limons

Prélever 20 ml à 10 cm de profondeur au bout de 4 min à 20°, vider le contenu de la pipette dans une capsule de 50 ml environ. Faire sécher à 105°C.

II-5-4-Détermination des argiles

Opérer exactement de la même façon après repos de 6 heures à 20°C.

II-5-5-Détermination des sables

La détermination des sables est réalisée après élimination des argiles et des limons par siphonage.

Répéter l'opération plusieurs fois jusqu'à ce que le liquide surmontant les sables soit exempt de limon et d'argile. Récupérer les sables en les faisant passer dans une grande capsule.

Porter les sables à l'étuve pour déterminer le poids et les fractions en sables fins et sables grossiers. Fractionner les sables par tamisage (utiliser les tamis de 200µm, 50µm et 20µm).

III- Isolement des actinomycètes

Pour chaque échantillon, 10g de sédiments sont dilués dans 90ml d'eau physiologique stérile, puis agités au vortex deux fois pendant 5 minutes, cette suspension constitue la dilution 10^{-1} . Une série de dilutions décimales (jusqu'à 10^{-4}) est effectuée pour chaque échantillon.

100 μ l par dilution par boîte de Pétri sont étalés en surface de trois milieux de cultures : la gélose à l'extrait de levure et de malt (GLM), le milieu Williams (M_2) et le milieu Williams modifié (M_3) (la composition de tous les milieux utilisés est donnée en annexe N°1). Ces milieux sont additionnés de 75 μ g/ml d'amphotéricine B pour inhiber le développement des champignons filamenteux et de 10 μ g/ml de polymyxine pour inhiber les bactéries à Gram négatif.

Les boîtes de Pétri sont alors incubées à 28°C. Elles sont observées après deux, trois et quatre semaines d'incubation.

A l'aide d'une loupe binoculaire, les colonies actinomycétales sont repérées d'après leur aspect macroscopique caractéristique (colonies filamenteuses dures incrustées dans la gélose). Puis par leur aspect microscopique (colonies circulaires constituées d'hyphes), par observation directe sous microscope optique au grossissement $\times 10$.

Pour une observation claire, 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 (grossissement $\times 40$), (**Suzuki, 2001**).

Les colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes, sont purifiées sur le milieu M_2 exempt cette fois-ci d'antifongiques et d'antibactériens.

Les isolats purifiées appartenant aux actinomycètes sont conservées sur Gélose inclinée M_2 (après incubation à 28°C pendant 21 jours), les cultures sont ainsi conservées à -4°C et un repiquage est réalisé tous les deux mois.

IV- Recherche de l'activité antimicrobienne

IV-1- Recherche de l'activité antibactérienne

➤ Inocula des bactéries-tests

L'activité antibactérienne des souches d'actinomycétales isolées est recherchée contre des bactéries-tests (collection du laboratoire de Microbiologie, Université du Sétif) à Gram positif :

- *Staphylococcus aureus* (SARM) ATCC 43 300
- *Staphylococcus aureus* ATCC 25 923
- *Listeria innocua* CLIP 74915

et à Gram négatif :

- *Escherichia coli* ATCC 25 922
- *Klebsiella pneumoniae* E47
- *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27 853

A partir d'une culture de 18h sur le milieu nutritive (GN), une suspension de chaque bactérie-test en eau physiologique (9% de NaCl) est préparée. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution à 0,5% de McFarland (densité optique égale à 0,2 à une longueur d'onde correspondante à chaque souche) de façon à obtenir d'une concentration finale de 10⁶ UFC/ml, ensuite, un ensemencement par écouvillonnage est réalisé sur milieu Muller Hinton (Cavalla et Eberlin, 1994).

➤ Technique des cylindres d'agar

Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées sur le milieu M₂ et incubées à 28°C pendant 14 jours. Des cylindres d'agar de 6mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'aide d'un emporte pièce et déposés à la surface du milieu Muller Hinton préalablement ensemencé avec les bactéries-tests (figure N°9). Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 2 heures, puis incubées à 37°C pendant 18 à 24heures. Les diamètres sont alors mesurés à l'aide d'un pied à coulisse (Lee et Hwang, 2002).

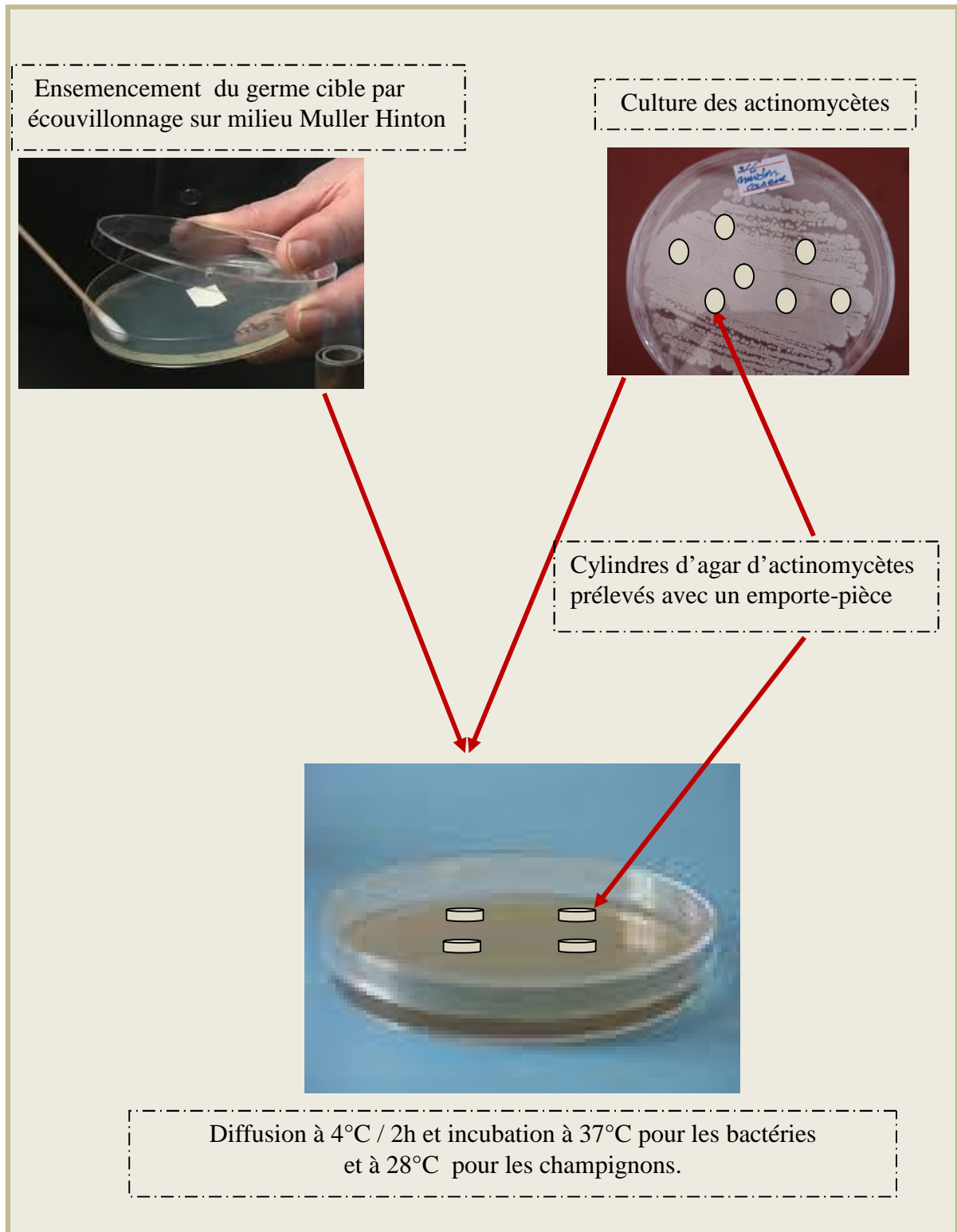


Figure N° 9 : Test de mise en évidence de l'activité antimicrobienne par la technique des cylindres d'agar (Lee et Hwang, 2002).

IV-2- Recherche de l'activité antifongique

L'activité antifongique des actinomycètes isolées est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les champignons filamenteux (collection du laboratoire Biochimie Microbienne de l'université de Bejaia) :

Aspergillus niger 2CA 936

Aspergillus flavus NRRL 391

et contre une levure: *Candida albicans* (ENS Kouba) avec une charge de 10^7 spore/ml ou 10^7 UFC/ml pour chaque souche. L'activité est testée sur milieu potato dextrose d'agar (PDA) (Figure N°9). Le diamètre d'inhibition est mesuré après 24 heures d'incubation à 28°C pour les levures et après 48 heures pour les champignons filamenteux.

B-Identification morphologique, physiologique biochimique et chimiotaxonomie de la souche sélectionnée

Les souches d'actinomycète sélectionnées seront soumises à une étude de différents caractères morphologiques, culturels, physiologiques, biochimiques et chimiotaxonomique dans le but de leur identification (Figure N°10).

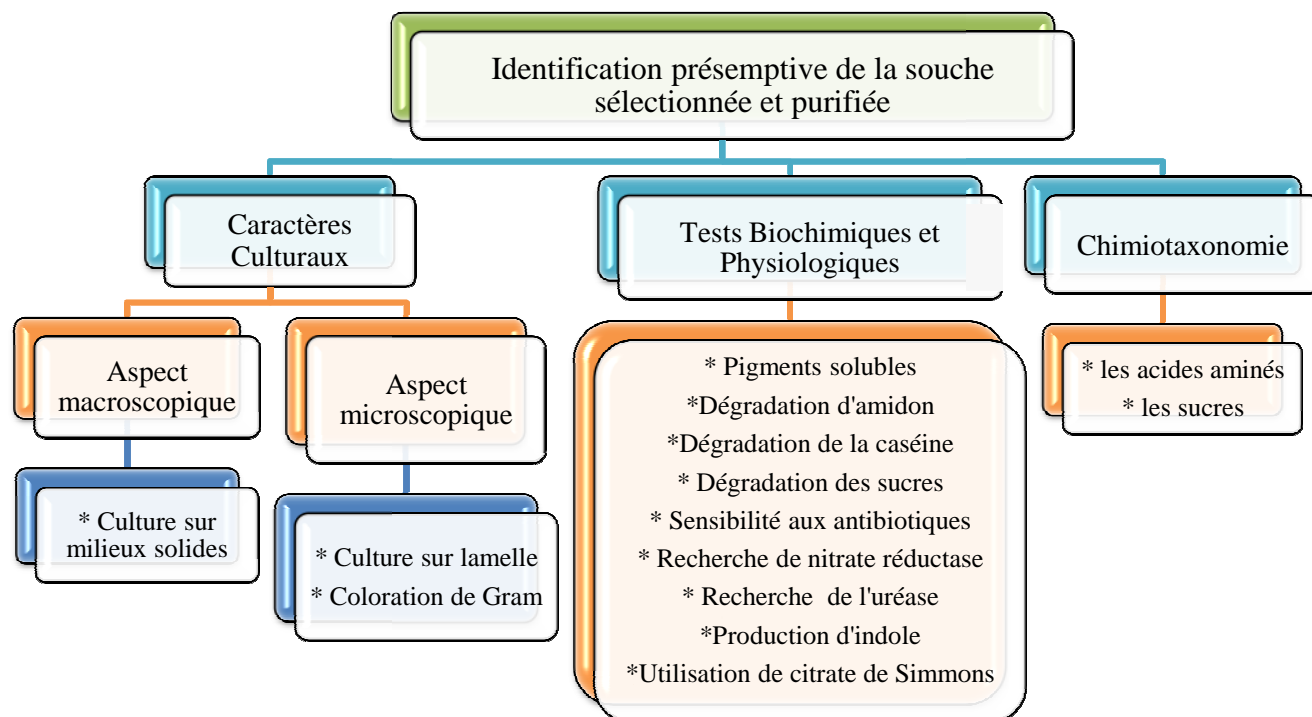


Figure N°10 : Identification présumptive de la souche sélectionnée et purifiée

I- Préparation de l'inoculum de la souche sélectionnée

La souche d'actinomycète conservée sur gélose M₂, est ensemencée sur le même milieu gélosé. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 14 jours. A partir de ces boîtes une suspension dense de fragments mycéliens et des spores est prélevée et introduite dans un flacon contenant de l'eau distillée stérile. Cet inoculum sert à ensemencer tous les milieux utilisés (Kitouni, 2010).

II- Etude morphologique

II-1-Caractères cultureux

Les caractères morphologiques et cultureux sont déterminés sur des milieux de culture spécifiques (Annexe N°1) : ISP₂, ISP₅ recommandés par **Schirling et Gottlieb (1966)**, le milieu Amidon-Caséine Agar, le milieu Glucose Extrait de Levure-Peptone (GLP).

Les milieux sont coulés dans les boîtes de Pétri 36 heures avant l'utilisation, afin de diminuer l'humidité à la surface de la gélose et de contrôler leur stérilité. Ils sont ensuite ensemencés en stries à partir d'une goutte de l'inoculum déposée en bordure de la gélose. L'évaluation de l'importance de la croissance et du développement du mycélium aérien sur chaque milieu est observée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C.

L'aspect macroscopique (couleur, forme, etc.) des colonies est observé après 21 jours d'incubation à 30°C (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Mocheva et al., 2002 ; Oskay et al., 2004**).

L'observation de la pigmentation du mycélium secondaire et du mycélium du substrat et la recherche de présence dans la gélose des pigments diffusibles autres que les pigments mélanoides sont réalisées en même temps.

II-2-Aspect microscopique

L'observation de la morphologie des chaînes de spores, du mycélium aérien et du mycélium du substrat est effectuée selon la technique suivante :

❖ Technique de culture sur lamelle

Cette technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans un milieu gélosé ISP2 ou ISP5, de telle sorte qu'elle forme un angle de 45°C avec la surface de celui-ci. Une goutte de l'inoculum est déposée contre la lamelle en contact avec le milieu. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la lamelle est retirée soigneusement de la gélose, entraînant avec elle des fragments du mycélium du substrat et aérien, elle est ensuite déposée sur une lame puis examinée au microscope optique (Gx100) (Figure N°11) (**Williams et Cross, 1971**)

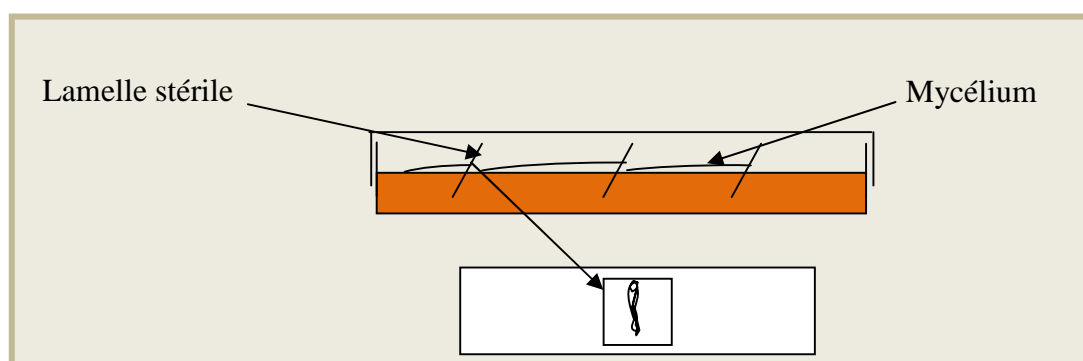


Figure N°11 : Technique de culture sur lamelle

❖ Coloration de Gram

Elle est effectuée selon la méthode classique. Des frottis de colonies des actinomycètes sont préparés, fixés à l'alcool de préférence pour ne pas perturber la structure, colorés puis observés sous microscope optique (G x100). Les colonies à Gram positif sont toutes repiquées sur le milieu Williams (M₂) et conservées à 4°C.

III- Etude physiologique

III-1-Détermination des pigments mélanoïdes et des pigments diffusibles

La mise en évidence des pigments mélanoïdes produits par les souches actives est réalisée sur le milieu ISP₇ (Annexe N°1). Une boîte non ensemencée sert de témoin. L'observation de la couleur brune noir caractéristique des pigments mélanoïdes se fait au 2^{ème} et au 4^{ème} jusqu'au 7^{ème} jour, en comparant les boîtes ensemencées avec le témoin (**Shirling et Gottlieb, 1966 ; Mocheva et al., 2002**). S'il y a production de pigments diffusibles de couleurs différentes autre que la couleur brune-noir caractéristique des pigments mélanoïdes, la couleur est notée (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

III-2-Hydrolyse de l'amidon

Ce test est réalisé sur milieu nutritif gélosé contenant 1% d'amidon soluble selon la méthode de **Gordon et Smith (1953)**. Après 14 jours d'incubation à 30°C, la gélose est recouverte d'une solution de lugol. L'hydrolyse est ainsi mise en évidence par l'absence de la coloration autour des colonies. A l'inverse les zones contenant d'amidon se colorent en brun.

III-3-Hydrolyse de la caséine

L'hydrolyse de la caséine est étudiée selon la méthode de **Williams et Cross (1971)** et de **Gordon et Smith (1953)** sur un milieu gélosé contenant 5% de lait écrémé. L'apparition de toute zone claire autour des colonies après 14 jours d'incubation à 30°C témoigne de l'hydrolyse de la caséine.

III-4-Dégradation des glucides et dérivés

Le milieu de base utilisé est Milieu ISP9 (**Goodfellow, 1971**) et les sucres utilisés sont : glucose, lactose, maltose, mannitol, fructose, cellulose, saccharose et le xylose ajoutés au milieu de base à raison de 1%.

III-5-Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité de la souche sélectionnée vis-à-vis de différents antibiotiques a été réalisée sur milieu Muller- Hinton. Les disques d'antibiotiques utilisés sont :

- Imipenème (IMP).....10µg
- Piperacilline (PI¹⁰⁰).....100µg
- Tobramycine (TOB³⁰).....30µg
- Cefoxitine (FOX).....30µg
- Ciproflaxacine (CIP).....5µg
- Rifampine (RA).....30µg
- Gentamicine (CN).....10µg
- Ticarcilline/clavulamique (TCC).....75/10µg
- Ceftazidine (CAZ).....30µg
- Cefotaxime (CTX).....10µg

III-6-Croissance à différentes températures

La croissance de l'isolat a été étudiée à cinq températures (28, 30, 37, 45 et 50°C) sur le milieu M₂. La lecture a été faite chaque 24h durant un mois.

III-7-Croissance à différents pH

Une colonie d'actinomycète est ensemencée par tube de gélose inclinée du milieu M₂ solide à différentes valeurs de pH (4; 5; 7 et 9).

Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies chaque 24h durant un mois.

IV- Caractères biochimiques

IV-1-Recherche de l'Uréase

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes de l'Urée-indole sont ensemencés par 0,5 ml de la suspension de la souche à étudier. La lecture est effectuée après incubation à 30°C pendant 24 heures.

- ❖ Si la couleur du milieu vire vers le rouge donc Uréase positive.
- ❖ Si la couleur du milieu reste jaune donc Uréase négative.

IV-2-Recherche de la production d'Indole

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes de l'Urée-indole sont ensemencés par 0,5 ml de la souche. La lecture est effectuée après 24 heures incubation à 30°C. 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées à 1ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface.

IV-3-Recherche de la Nitrate-Réductase

La Nitrate-Réductase est une enzyme qui catalyse la réduction des nitrates (NO₃) en nitrites (NO₂) ou en N₂. Elle est mise en évidence selon le protocole de **Gordon et Smith (1953)**. 10 ml de bouillon nutritif contenant 0,1% de nitrate de potassium sont ensemencés par les souches d'actinomycètes puis incubés à 30°C. Au 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jours d'incubation, 3 gouttes de chacun des réactifs de Nitrate Réductase (NRI et NRII) sont ajoutées.

La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une couleur rouge orangée, en cas d'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés, s'il y a :

- ❖ apparition de coloration rouge : présence de nitrate dans le milieu et les souches ne possèdent pas l'enzyme.
- ❖ apparition de couleur jaune : pas de nitrate dans le milieu et les souches possèdent l'enzyme qui réduit les nitrates jusqu'au stade N₂.

IV-4-Utilisation du citrate comme source de carbone

La pente du milieu Citrate de Simmons estensemencée par strie longitudinale au moyen d'une anse de platine avec un inoculum de la souche à étudier. L'incubation s'effectue à 30°C. L'observation de la croissance se fait quotidiennement pendant une semaine.

IV-5-Détermination de la mobilité

Elle est réalisée sur le milieu semi solide de mannitol-mobilité (**Guiraud, 1998**), l'ensemencement est réalisé par piqûre centrale. Après incubation pendant 7 jours à 30°C, la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu à partir de la piqûre d'inoculation.

V- Etude chimio-taxonomique

Parmi les acides aminés constitutifs pariétaux des actinomycètes, la glycine et l'acide diamino-2,6-pimélique (DAP) sont les marqueurs utilisés pour la classification de ce groupe bactérien.

Les sucres caractéristiques de différents types de paroi sont l'arabinose, le galactose et le madurose.

Les différents isomères de l'acide diamino-2,6-pimélique (DAP), les aminoacides et les sucres de la paroi cellulaire sont déterminés par les techniques de **Becker et al. (1964)** et **Staneck et Roberts (1974)**.

V-1-Obtention du mycélium

La souche sélectionnée estensemencée dans des flacons contenant 50 ml de milieu M₂ liquide et incubée sous agitation à 28°C pendant une semaine. Les mycéliums sont

récupérés par filtration sur papier Wattman. Après trois lavages à l'eau distillée, ils subissent un séchage à 30°C.

V-2-Détermination des acides aminés des cellules entières

Elle consiste en la détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique (DAP) et de rapporter la présence ou l'absence de la glycine.

Deux méthodes sont utilisées celle de **Becker et al. (1964)** et celle de **Staneck et Roberts (1974)** qui consistent en une hydrolyse cellulaire à chaud en présence de l'acide chlorhydrique comme suit :

- 20 à 30 mg des cellules entières (HCl 6N à 100°C pendant 18 heures) dans un tube scellé hermétiquement fermé (**Becker et al., 1965**).

-Après refroidissement, l'hydrolysate est récupérée par filtration sur membrane en verre ou sur du papier Whatman N°1.

- Evaporer à sec à l'aide d'un bain de sable à chaud ou rotavapeur; puis des lavages répétés à l'eau distillée sont effectués pour éliminer l'HCl.

- Le résidu sec est finalement repris dans 0,3 ml d'eau distillée.

- Réaliser une chromatographie ascendante.

✓ Analyse chromatographique de l'hydrolysate

• **Migration** : L'hydrolysate est chromatographie sur couche mince de gel de silice dans le système de migration : méthanol-eau-HCl 6N-pyridine (40 :13 :2 :5 v/v).

• **Révélation** : Après séchage le chromatogramme est révélé par pulvérisation d'une solution acétonique à 0,2% de ninhydrine et chauffage à 100°C pendant 5minutes (**Staneck et Roberts, 1974**).

Les différentes formes de l'acide 2,6 diaminopimélique (DAP) se caractérisent par une couleur vert olive (Figure N°12).

V-3-Détermination des sucres

La méthode de caractérisation des sucres utilisée est celle de **Lechevalier et Lechevalier (1970b)** et **Staneck et Roberts (1974)**.

Les sucres de la paroi sont déterminés à partir de l'hydrolysat de 50 mg de cellules entières par l'acide sulfurique 1N pendant 2 heures à 100°C dans un tube scellé.

L'hydrolysat acide est neutralisé avec une solution aqueuse saturée d'hydroxyde de Baryum ($\text{Ba}(\text{OH})_2$) jusqu'à obtention d'un pH neutre. Le précipité de BaSO_4 obtenu est éliminé par centrifugation à 4 000 rpm pendant 20 minutes, (centrifugeuse SIGMA 2-16PK).

Le surnageant est évaporé à sec. Le produit final est dissout dans 0,3 ml d'eau distillée puis analysé par chromatographie ascendante.

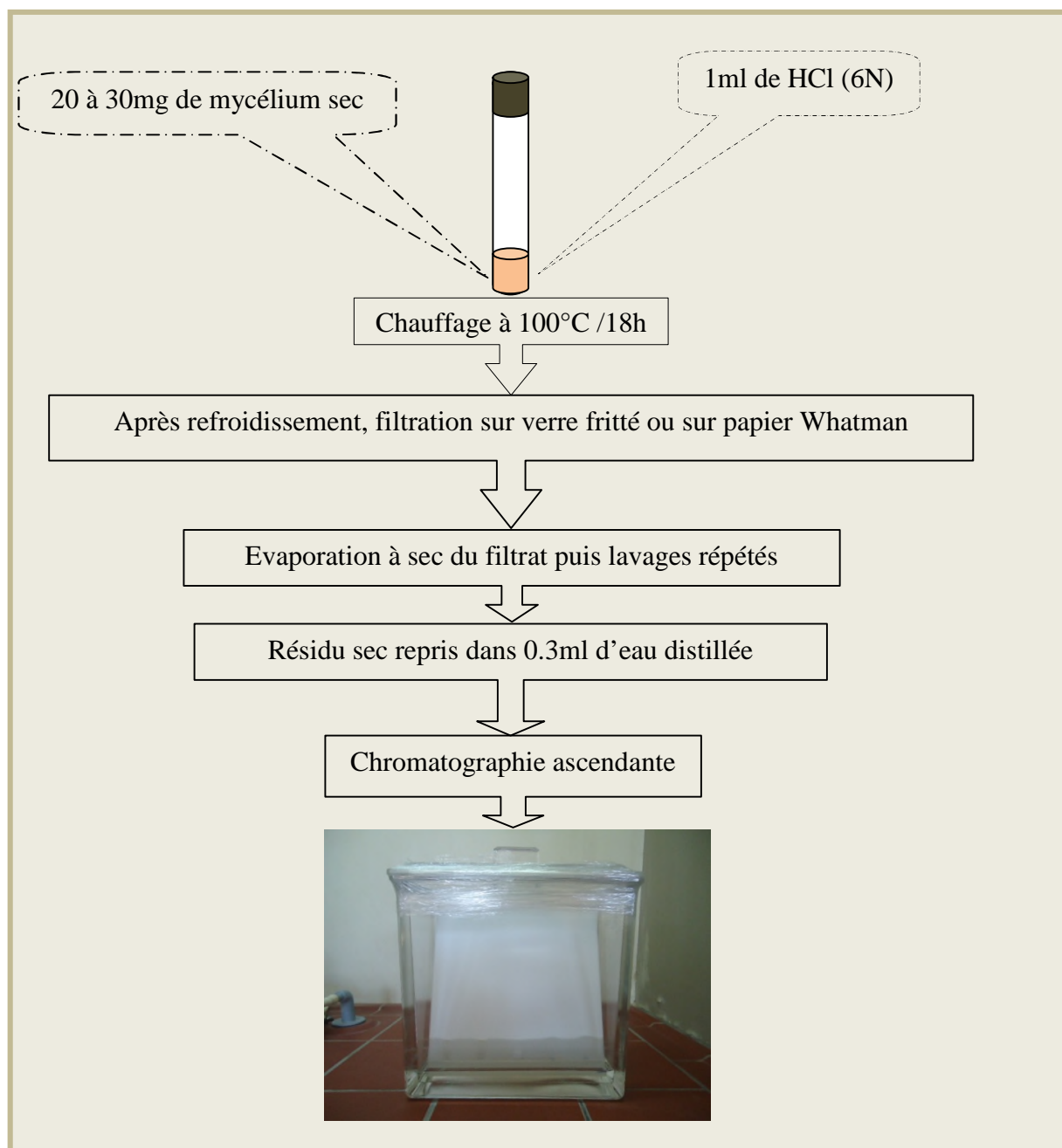


Figure N°12: Etapes suivies pour déterminer les acides aminés cellulaires des actinomycètes (Becker et *al.*, 1965).

✓ **Analyse chromatographique des hydrolysats**

- **Migration** : 20 μ l de l'hydrolysate ainsi que les sucres témoins utilisés (ribose, arabinose, rhamnose, xylose et galactose) à 0,1% (P/V) sont déposés sur une plaque de gel de silice. Après séchage une chromatographie ascendante est réalisée dans le système de solvant constitué de n-butanol-eau distillée- pyridine-toluène (10/6/6/1 v/v) (**Staneck et Roberts, 1974**).
- **Révélation** : Les sucres sont révélés par pulvérisation du réactif d'aniline-acide phtalique suivi d'un chauffage à 100°C pendant 4minutes. Les pentoses sont distingués par des taches roses tandis que les hexoses par des taches brunes (Figure N°13).

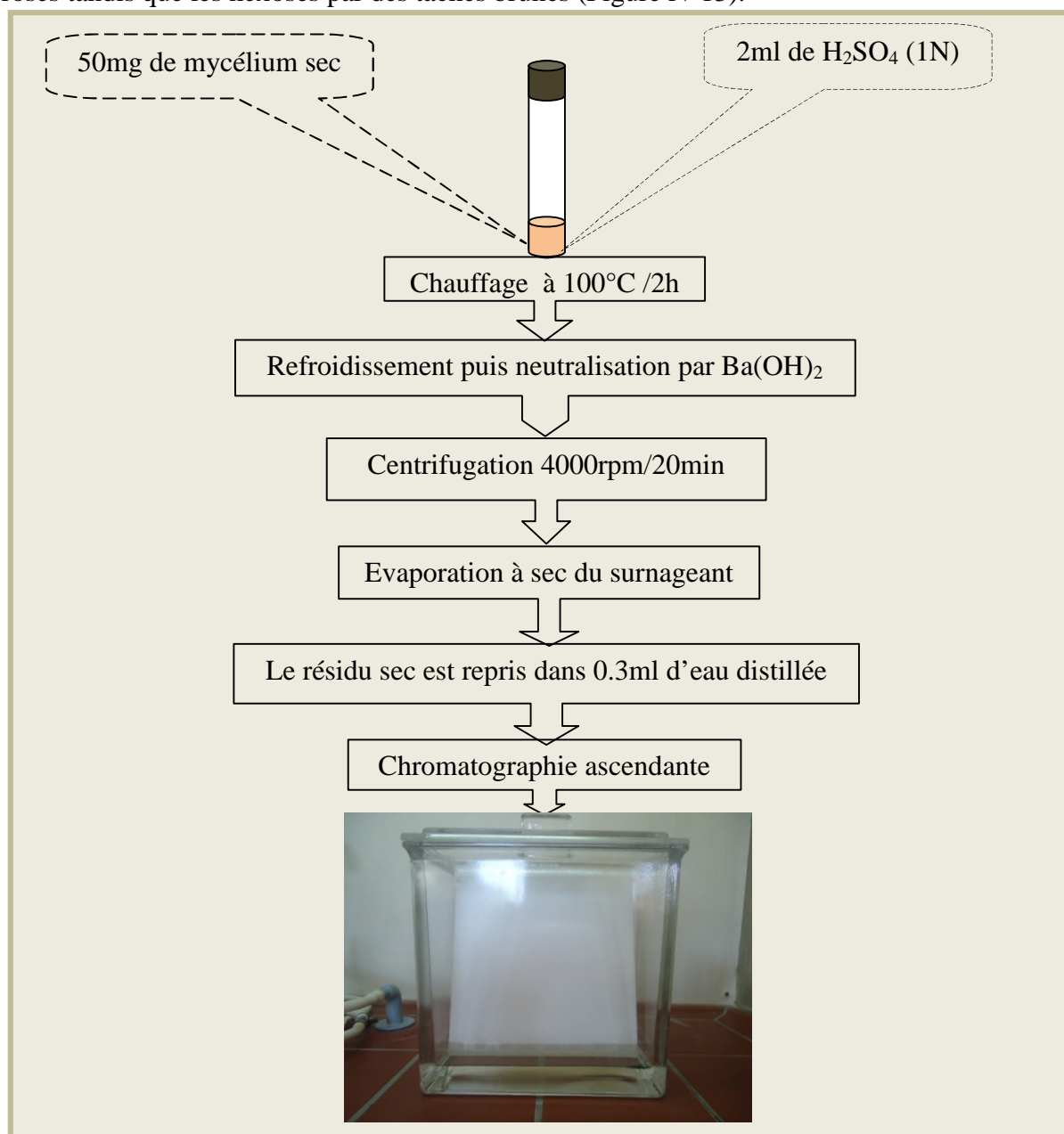


Figure N°13: Etapes suivies pour déterminer les sucres cellulaires des actinomycètes (**Lechevalier et Lechevalier (1970b)**).

VI- Suivi de la croissance de la souche sélectionnée sur des milieux liquides

Quatre milieux de cultures différents (ISP₂, ISP₅, PELG et M₂) préconisés pour suivre la croissance de la souche sélectionnée ont été testés.

VI-1- Préparation de la préculture

Les précultures sont préparées dans des flacons d'une capacité de 200 ml, contenant 50 ml des milieux spécifiques liquides (ISP₂, ISP₅, PELG et M₂). Ces milieux sontensemencés aseptiquement par la solution sporale de la souche d'actinomycète représentative de concentration 10⁵ spores/ml. Les précultures sont ensuite placés dans un bain marie thermostaté à 28° C et animés d'un mouvement de va et vient pendant 3 jours, puis elles serviront d'inoculum pour l'essai de la fermentation.

VI-2- Essai de culture en discontinue

Après vérification de la pureté de la préculture par observation microscopique, on introduit stérilement 4 ml de la préculture dans 40 ml de chaque milieu de culture frais (ISP₂, ISP₅, PELG et M₂). L'inoculation se fait par un simple transfert de volume de la préculture dans l'un des milieux frais. Les conditions de l'incubation sont les mêmes que pour la préculture sauf que la durée est de 10 jours.

VI-2-1-Suivi de la culture

A partir du temps zéro, des prélèvements sont réalisés chaque 48 heure pour mesurer le pH, suivre la croissance de la souche d'actinomycète et la production de la substance bioactive. La vérification de la pureté est aussi faite au même temps par une observation microscopique à l'état frais ou coloré de la souche.

➤ Mesure de pH

La valeur du pH est mesuré à l'aide d'un pH mètre après stabilisation.

➤ Evaluation de la biomasse

La biomasse est évaluée en centrifugeant du moût de fermentation à 4000g /30min (4°C) à l'aide d'une centrifugeuse SIGMA 2-16K, Après deux lavage à l'eau distillée, le culot

est récupère dans des capsules en porcelaine préalablement tarées puis séchées à 105C° pendant 24 h.

➤ **Mise en évidence de la production des substances bioactives sur milieux liquide**

Le surnageant ainsi obtenu par centrifugation est filtré sur filtre Millipore (0,45µm de porosité) afin de le stériliser. La recherche de l'activité antimicrobienne de tous les filtrats des milieux de culture liquides (ISP₂, ISP₅, PELG et M₂) est réalisée sur milieu Muller Hinton par la technique des puits.

➤ **Technique des puits**

A l'aide d'un emporte-pièce, des puits de 6 mm de diamètre chacun sont creusés dans le milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les microorganismes tests. Une goutte de gélose blanche est déposée au fond de chaque puits, pour éviter la diffusion des surnageants au fonds des boites.

Une quantité de 25 µl des surnageants des cultures liquides des Actinomycètes est déposée dans chaque puit.

Les boites sont placées à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 30°C pour les champignons.

Les diamètres d'inhibitions autour du puits sont mesurés et notés après 18 h à 24 heures pour les bactéries et *Candida albicans* et après 24 h à 48 heures pour les champignons filamenteux.

Résultats et discussion

A-Isolement des actinomycètes et mise en évidence de l'activité antimicrobienne (criblage)

Dans ce qui suit, seront présentés les résultats et la discussion de ce travail, relatifs aux caractéristiques physicochimique des échantillons, l'isolement des souches actinomycétales, la mise en évidence de leur activité antibiotique (leur criblage) et enfin, l'identification présomptive de la souche sélectionnée.

I- Caractéristiques physicochimiques des échantillons

Les propriétés physicochimiques des trois échantillons prélevés (SM, SE et SS) (pH, pourcentage d'humidité, conductivité et taux de matière organique) sont résumées dans le tableau suivant :

Tableau N°7: Paramètres physicochimiques des trois échantillons de sédiments.

	pH	Conductivité (mS)	Taux d'humidité (%)	Matière organique (%)
SM	8,44	9,09	31,9	8,23
SE	8,45	5,72	30,2	3,98
SS	7,47	1,013	28,1	11,9

mS: milli Siemens, **SM:** sédiments de la plage, **SE:** sédiment de l'embouchure **SS:** sédiments du lit de l'Oued Soummam

Les échantillons examinés se caractérisent par des valeurs de pH allant de 7,47 à 8,45. L'échantillon SS dont le pH est de 7,47 est un sédiment neutre, alors que les échantillons SM et SE dont les pH respectifs sont 8,44 et 8,45 sont des sédiments qui tendent vers l'alcalinité. D'après **Lee et Hwang (2002)**, on distingue trois types de sols en fonction du taux d'humidité (Tableau N°8). Les résultats présentés dans le tableau N°7 indiquent que les échantillons SM, SE et SS sont des sédiments caractérisés par des taux d'humidité élevés.

Tableau N°8 : Type de sol en fonction du taux d'humidité selon **Lee et Hwang (2002)**,

	Type de sol		
	Faible	Modéré	Elevé
Taux d'humidité (%)	2,0 et 9,0	9,1 à 13,0	13,1 et 20,0

D'après le tableau N°9, l'échantillon SM a un taux modéré de la matière organique (8,23%), contrairement à l'échantillon SS qui a un taux de matière organique très élevé (>11%). Alors que, l'échantillon SE a le plus faible taux de la matière organique (3,98%).

Tableau N°9 : Type de sol en fonction de matière organique (Lee et Hwang, 2002),

	Type de sol		
	Faible	Modéré	Elevé
Matière organique (%)	4,0-7,0	7,1-9,0	9,1-11,0

En se basant sur les résultats de la conductivité présentés dans le tableau N°8 et d'après l'échelle de salinité qui est en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux 1/5^{ème}, présentés dans le tableau N°10, nous avons pu classer l'échantillon SE, dont la conductivité est comprise entre 2,4 et 6 (5,72mS), comme un sol très salé, et que le sol (sédiment) de l'échantillon SM est un sol (sédiment) extrêmement salé vu que sa conductivité est nettement supérieure à 6mS (9,09mS), contrairement à l'échantillon SS qui est considéré comme un sol (sédiment) peu salé vu sa conductivité comprise entre 0,6-1,2 (1,013mS).

Tableau N°10 : Type de sol en fonction de la conductivité électrique (Richards, 1969).

	Types de sol				
	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
C. ex 1/5 (mS)	<0,6	0,6 - 1,2	1,2 - 2,4	2,4 - 6	>6

C. ex 1/5 (mS) conductivité de l'extrait aqueux 1/5ème ; mS : milli Siemens

Ces trois échantillons ont des conductivités très différentes. Alors nous pouvons les considérer comme des écosystèmes extrêmes.

Tableau N°11 : Analyse granulométrique de l'échantillon SS.

	Granulométrie (%)			
	Argile	Limon	Sable fin	Sable grossier
Echantillon SS	37,93	18,56	9,88	15,05

Le tableau ci-dessus, qui représente les résultats de l'analyse granulométrique nous indique que l'échantillon SS est de texture Argileuse (37,93%).

II-Isolement, purification et conservation des actinomycètes

Tableau N°12 : Résultats de l'isolement des actinomycètes à partir des 3 échantillons.

Échantillon	Milieux	Bactéries	Champignons	Actinomycètes
SM	GLM	Absentes	Absents	Absentes
	M ₂	Absentes	Absents	Absentes
	M ₃	Absentes	Absents	Absentes
SE	GLM	Présentes	Présents	Absentes
	M ₂	Absentes	Absents	Absentes
	M ₃	Absentes	Absents	Absentes
SS	GLM	Absentes	Absents	Absentes
	M ₂	Absentes	Absents	Absentes
	M ₃	Présentes	Présents	Présentes
Totale des actinomycètes			16 Isolats	

La recherche des bactéries actinomycétales, réalisée à partir des trois échantillons sur les trois milieux de culture : la gélose à l'extrait de levure et de malt (GLM), le milieu Williams (M₂) et le milieu Williams modifié (M₃) additionnés de 75µg/ml d'amphotéricine B et 10µg/ml de polymixine, a donné les résultats présentés ci-dessus.

Au bout de 7 jours d'incubation à 28°C, les actinomycètes apparaissent et se développent lentement. Les colonies sont repérées d'après leur aspect caractéristique et sont purifiées aux fins de conservation.

Le tableau N°12 montre que les deux milieux (GLM et M₂) n'ont pas permis d'isoler des actinomycètes à partir des trois échantillons au contraire du milieu M₃ qui nous a permis d'avoir 16 isolats d'actinomycètes isolées pour l'échantillon SS uniquement.

Ceci peut s'expliquer par le fait que l'échantillon SS est plus riche en matière organique que les échantillons SM et SE, bien que le degré de salinité de l'échantillon SS soit inférieur à celui des échantillons SM et SE. Ceci est corroboré par la bibliographie sur ces actinomycètes qui confirme que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de matière organique quelque soit le taux de la salinité du sol (Lee et Hwang, 2002).

Il faut noter que le taux d'humidité de cet échantillon est considéré comme le plus faible taux par rapport aux sédiments SE et SM (Figure N°14). En fait, selon certains auteurs, le nombre d'actinomycète isolés est inversement proportionnel au taux d'humidité des échantillons (Sykes et Skinner, 1973 ; Basilio, 2003).

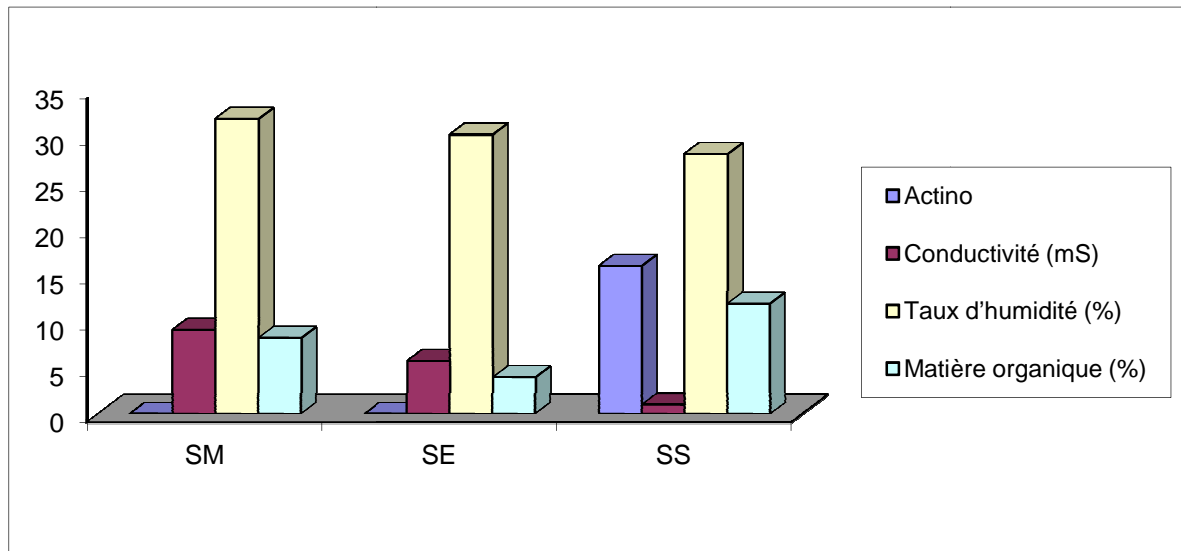


Figure N°14: Taux d'actinomycètes isolés des sédiments en fonction de la conductivité, du taux de matière organique et du taux d'humidité.

III- Criblage des actinomycètes productrices d'antibiotiques

Les souches isolées sont morphologiquement différentes. Les colonies des isolats cultivés sur le milieu M2 sont rugueuses, très incrustées dans la gélose, de taille variable. Le mycélium de substrat (MS) est de couleur blanche à beige pour les isolats **SSB₁**, **SSB₂**, **SSB₃**, **SSB₄**, **SSB₅**, **SSB₆**, **SSB₇** et **SSB₈** et de couleur rose pour **SSR₁**, **SSR₂**, **SSR₃**, **SSR₄**, **SSR₅**, **SSR₆**, **SSR₇** et **SSR₈**. Même remarque pour le mycélium aérien (MA) pour tout les isolats.

➤ Test des cylindres d'agar

Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé Muller Hinton (MH) pour détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les microorganismes tests utilisés.

Le développement d'un germe test, ensemencé sur la gélose par écouvillonnage, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible comme le montre les

planches N° 1, 4 et 5 (planche N°4 et 5 sont citées en annexe N°2). Toutes les photographies ont été prises avec un appareil photo numérique de résolution de 7,2 Méga pixel, (Sony).

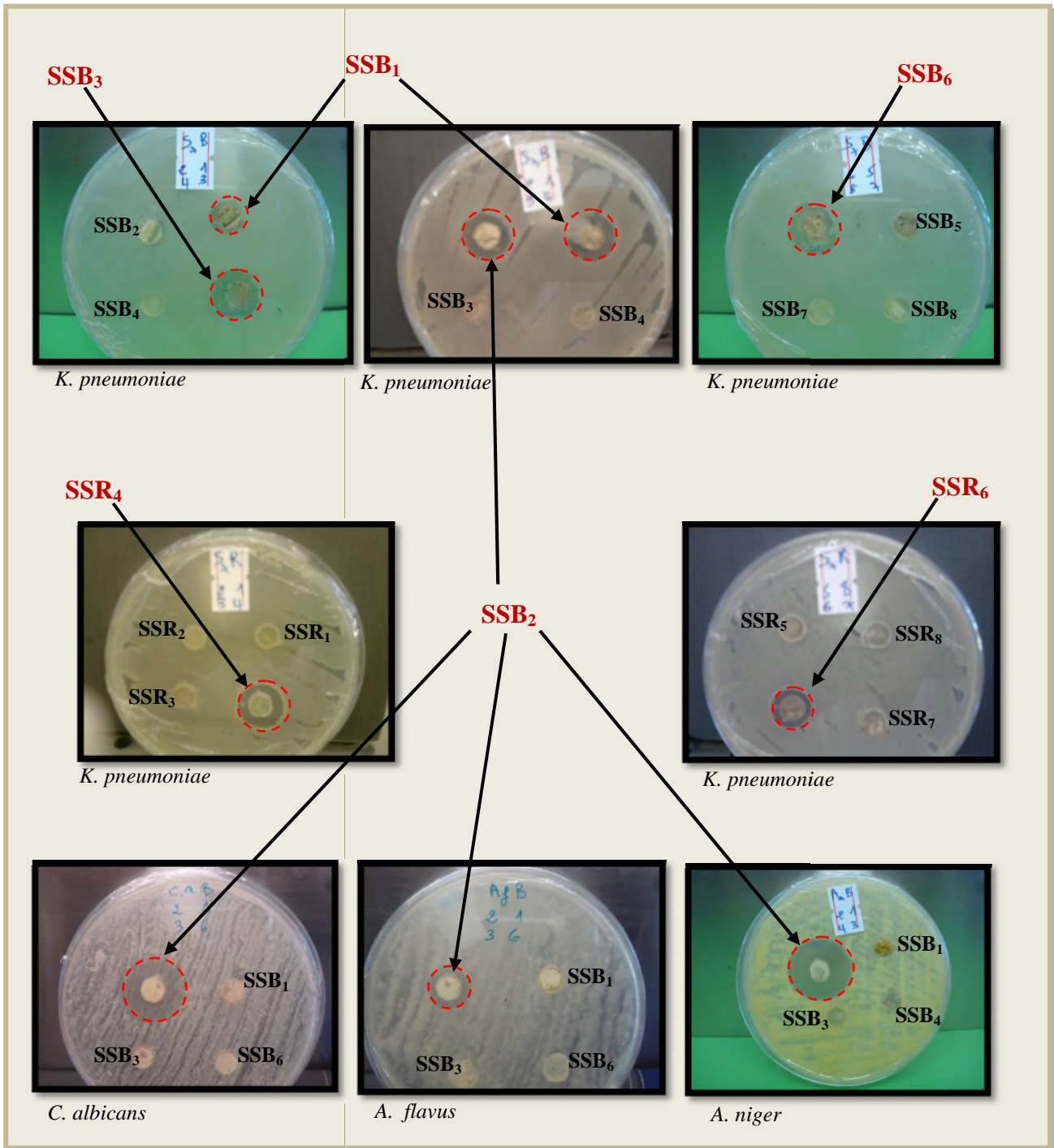


Planche N° 1 : Test d'activité des isolats actinomycétales vis-à-vis des germes cibles étudiés.

Les souches ayant présenté les zones d'inhibition les plus important sont signalées en rouge.

Des résultats résumés dans le Tableau N°13, il ressort que sur les 16 isolats, seules 06 souches d'actinomycètes sont actives sur au moins un des germes-tests étudiés.

Tableau N°13 : Activité antibactérienne des actinomycètes isolés.

Isolats	Gram +			Gram -			Fungi		
	<i>L. innocua</i>	<i>S. aureus</i> (SARM)	<i>S. aureus</i>	<i>K. pneumoniae</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>
SSB ₁	-	-	-	13,52	-	-	-	-	-
SSB ₂	-	-	-	12,37	-	-	13,77	17,86	12,96
SSB ₃	-	-	-	15,83	-	-	-	-	-
SSB ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSB ₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSB ₆	-	-	-	13,62	-	-	-	-	-
SSB ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSB ₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSR ₁	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSR ₂	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSR ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSR ₄	-	-	-	13,87	-	-	-	-	-
SSR ₅	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSR ₆	-	-	-	13,67	-	-	-	-	-
SSR ₇	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SSR ₈	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* - : pas d'inhibition , Les zones d'inhibition sont données en mm.

Les isolats **SSB₁**, **SSB₂**, **SSB₃**, **SSB₆**, **SSR₄** et **SSR₆**, isolés du sédiment de l'Oued Soummam, ont montré une activité contre une seule bactérie teste (*K. pneumoniae* E47). L'isolat **SSB₂** présente une activité vis-à-vis des souches fongiques testées (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et la levure *Candida albicans*), (planche N°1).

Pour les autres isolats, aucune activité n'a été détectée, (planches N°4 et N°5 citées en annexe N°2).

Les isolats **SSB₁**, **SSB₃**, **SSB₆**, **SSR₄** et **SSR₆**, présentent un antagonisme notable vis-à-vis de la bactérie *K. pneumoniae* où le diamètre des zones d'inhibition varie entre 12,37 et 15,83 mm. Ces isolats ont une activité spécifique contre *K. pneumoniae*, donc leurs substances bioactives ont un spectre d'action étroit. Le diamètre de la zone d'inhibition le plus important a été enregistré avec l'isolat **SSB₃** avec 15,83 mm.

Seul l'isolat **SSB₂** est doué d'au moins deux activités antibiotiques sur milieu solide. Ces activités sont variées : antibactérienne, antifongique et/ou anti-levurienne. Cette action est particulièrement importante contre la bactérie, *K. pneumoniae*, vis-à-vis les souches fongiques testées notamment *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* et contre la levure *Candida albicans* dont les zones d'inhibition sont respectivement de 12,37 ; 17,86 ; 12,96 et 13,77mm. (Tableau N°13).

Aucun des isolats n'a présenté d'activité vis-à-vis des bactéries à Gram négatif utilisées : *Escherichia coli* et *Pseudomonas aeruginosa*.

Srivibool et **Sukchotiratana (2006)**, qui ont obtenu des résultats comparables, expliquèrent que l'absence d'activité antibiotique vis-à-vis des bactéries à Gram négatif ne signifie pas forcément que la substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci, dans le milieu, car n'étant pas polaire ou alors qu'elle est constituée de composition non polaires.

Il est également probable que ces bactéries nécessitent, pour la production de certaines substances antibiotiques, des milieux de culture spécifiques. **Boughachiche et al. (2005)** et **Boudemagh et al. (2005)**, expliquèrent que les variations des zones d'inhibition sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

L'isolat **SSB₂** a été retenu pour une étude taxonomique (morphologique, biochimique, physiologique et chimio taxonomique). Cette sélection s'est faite sur la base de son activité antimicrobienne.

B- Identification morphologique, physiologique, biochimique et chimiotaxonomique de la souche sélectionnée


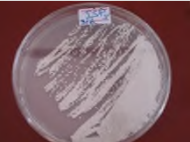


1-Etude morphologique

➤ Aspect macroscopique (Caractères cultureux)

Les colonies de l'isolat **SSB₂** apparaissent au bout de trois jours d'incubation à 28°C, après ensemencement sur différents milieux de culture gélosés (IPS₂, IPS₅, Amidon-Caséine et GLP).

Les caractères cultureux de cet isolat sur les quatre milieux de culture gélosés utilisés sont rassemblés dans le tableau N° 14. Cette souche se développe sur tous les milieux utilisés à des degrés de croissance de faible à abondant.

Tableau N°14: Caractères cultureux de l'isolat **SSB₂**

Milieu	Croissance	Sporulation	Mycélium aérien	Mycélium de substrat	Image
IPS ₂	Faible	Faible	Blanc- beige	Blanc-beige	
IPS ₅	Modérée	Modérée	Gris-beige	Gris-beige	
GLP	Modérée	Modérée	Blanc-beige	Blanc-beige	
Amidon-caséine	Abondante	Abondante	Beige-crème	Beige-crème	

Pour la souche, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies qui sont rondes à contours irréguliers, opaques. Les colonies adhèrent fermement au

milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension.

Au 14^{ème} jour l'isolat donne des colonies de surface poudreuse de différentes couleurs (blanc, beige, crème ou gris) selon le milieu, cet aspect est typique au cours du développement d'un mycélium aérien.

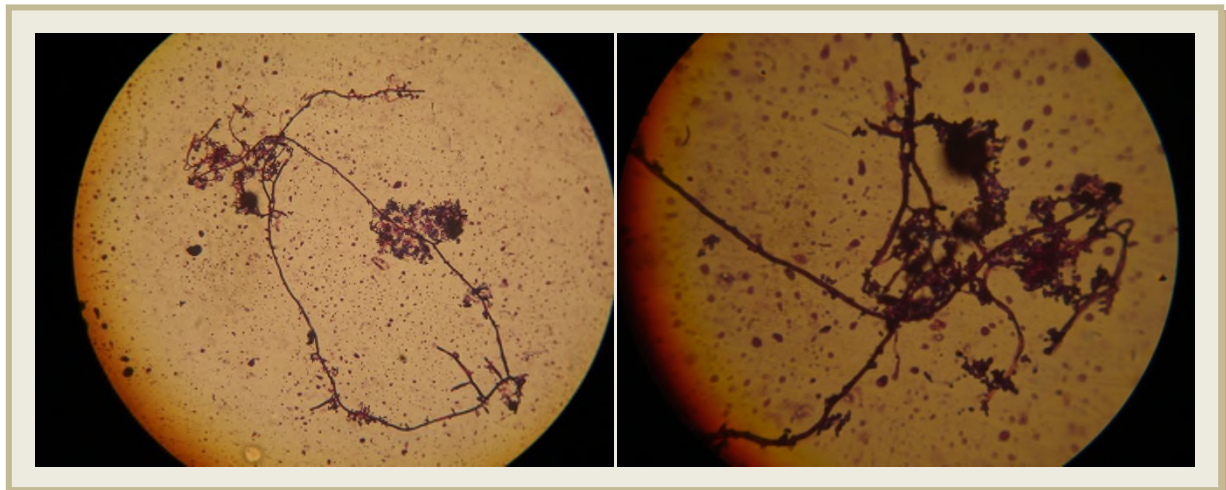
Au 21^{ème} jour d'incubation, la souche est non pigmentée, c'est le stade de maturation. L'observation du revers de la boîte permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être (beige, jaune ou crème).

Grâce à l'observation des colonies sous microscope optique au grossissement (Gx10) nous avons pu confirmer l'aspect filamenteux des isolats qui apparaissait tout autour des colonies d'une part, et de différencier les filaments irradiants des colonies, d'autre part.

➤ **Aspect microscopique**

✓ **Coloration de Gram**

Après observation des frottis colorés au microscope optique à l'objectif à immersion (G x 100) il s'est révélé que la souche d'actinomycète isolée est une bactérie filamenteuse, à coloration de Gram positive (Figure N°15), donc elle est de l'ordre des *Actinomycetales*



(G x100).

(G x100).

Figure N°15 : Observation microscopique après coloration de Gram de la souche **SSB₂**

✓ Culture sur lamelle

Les résultats de l'observation des lamelles déposées sur les lames sous microscope optique aux grossissements (G x40 et G x100) sont présentés dans la figure N°16.

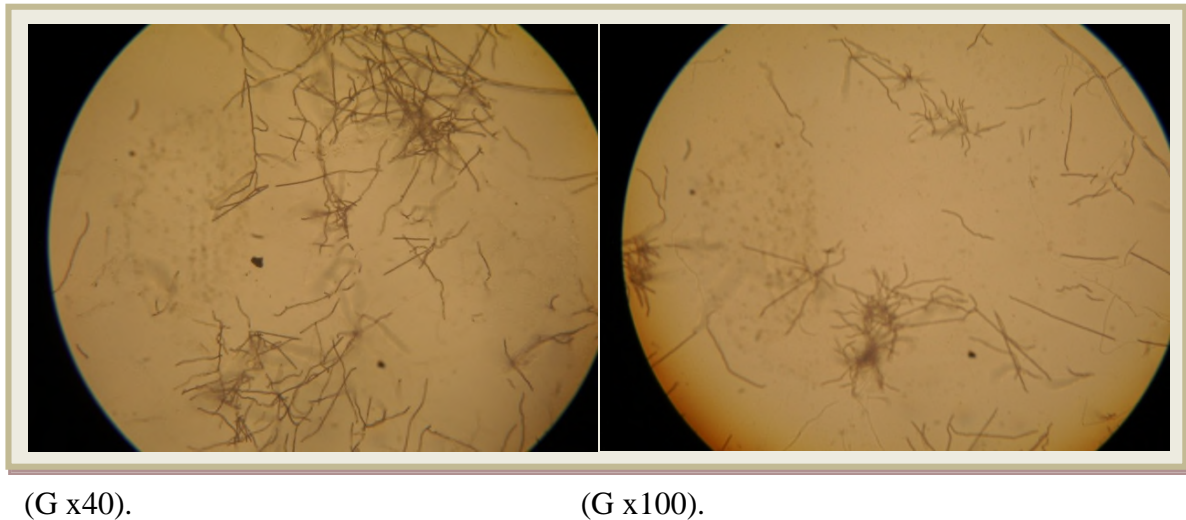


Figure N°16 : Observation microscopique des lamelles déposées sur lames de la souche **SSB₂**



(G x100).

Figure N°17 : Observation microscopique de *Streptomyces sp.* (Anonyme, 2006)

Sur la base de ce que précède (figure N°16 et 17), il y a une similitude très remarquable entre l'observation microscopique de la souche **SSB₂** et celle de *Streptomyces sp.* (Anonyme, 2006). En effet, nous pouvons classer cet isolat d'actinomycète dans le genre *Streptomyces* qui se caractérise par la présence de longues chaînes de spores allant de trois spores à plusieurs. Ces chaînes de spores ne sont pas droites.

Les filaments des mycéliums du substrat (MS) de l'isolat **SSB₂** sont fragmentés, non cloisonnés portant des chaînes de spores du type RF (*Rectus-Flexibilis*). Ce type de mycélium est caractéristique du genre *Streptomyces*.

2-Etudes physiologique et biochimique

Les résultats des différents tests physiologiques et biochimiques réalisés pour l'isolat **SSB₂** sont réunis dans le tableau N°15. Ceux-ci nous fournissent des éléments à même d'identifier nos souches au niveau de l'espèce comme ils permettent, en plus, la confirmation du genre.

Tableau N°15: Caractères physiologiques et biochimiques de l'isolat **SSB₂**

Test		Réaction
Production des pigments mélanoides sur ISP ₇		-
Hydrolyse de l'amidon		+
Hydrolyse de la caséine		-
Dégradation de : Glucose		+
Lactose		-
Mannitol		-
Fructose		+
Cellulose		+
Xylose		+
Saccharose		+
Maltose		+
Sensibilité aux antibiotique	Diamètre moyenne en (mm)	
- Imipenème (IMP)	30,25	S
- Piperacilline (PI ¹⁰⁰)	33,25	S
- Tobramycine (TOB ³⁰)	47,00	S
- Cefoxitine (FOX)	28,75	S
- Ciproflaxacine (CIP)	31,00	S
- Rifampine (RA)	35,75	S

- Gentamicine (CN)	32,25	S
- Ticarcilline/clavulamique (TCC)	27,50	S
- Ceftazidine (CAZ)	00	R
- Cefotaxime (CTX)	00	R
Croissance à température :		
28°C		+++
30°C		+++
37°C		++
45°C		+
50°C		-
Croissance à pH :		
4		+
5		++
7		++
9		+
Dégradation de l'urée		+
Production d'indole		-
Réduction du nitrate		+
Utilisation du citrate (comme seule source de carbone)		-
Mobilité		-

- : Test négatif, + : Test positif, + : Croissance faible, ++ : Croissance modérée, +++ : Croissance abondante,
R : Résistante, S : Sensible

Nos résultats s'avèrent insuffisant pour rattacher la souche étudiée à une espèce donnée, et ce en raison du faible nombre de tests réalisés.

La souche **SSB₂** ne produit pas de pigments mélanoïdes ou diffusibles sur le milieu ISP₇. Elle hydrolyse l'amidon mais pas la caséine.

L'isolat **SSB₂** cultivé sur le milieu ISP₉ se développe sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception du lactose et du mannitol.

Selon le comité de l'antibiogramme de la société française de microbiologie (CA-SFM), recommandation 2011, la souche **SSB₂** est considérée comme sensible aux antibiotiques : Imipenème, Piperacilline, Tobramycine, Cefoxitine, Ciproflaxacine, Rifampine, Gentamicine Ticarcilline/clavulamique. où le diamètre de la zone d'inhibition varie de 27,50 mm à 47,00 mm, mais elle est résistante aux antibiotiques Cefotaxime et Ceftazidine.

Cet isolat présente une bonne croissance entre 28 et 30°C, donc ces dernières sont des températures optimales de croissance, ce qui correspond à l'intervalle de température rapporté dans la bibliographie. A une température supérieure à 45°C la croissance est ralentie, à 50°C la souche **SSB₂** ne pousse plus.

La souche est capable de se développer dans une gamme du pH variant de 4 à 9, mais nous avons remarqué que la meilleure croissance a été enregistrée sur milieux où la valeur du pH est au voisinage de l'alcalinité.

L'isolat **SSB₂** hydrolyse l'urée mais elle ne produit pas d'indole. Elle réduit le nitrate, elle est immobile et n'utilise pas le mannitol et le citrate de Simmons comme source de carbone.

3- Etude chimio-taxonomique

Cette étude est faite pour assigner la souche **SSB₂** avec précision à un genre défini, car les caractères morphologiques, physiologiques et biochimiques ne sont pas suffisants parfois pour affilier cet isolat au genre correspondant. Les résultats obtenus après extraction et séparation des acides aminés et des sucres des hydrolysats cellulaires par la technique de chromatographie ascendante sur plaque de gel de Silice G₆₀ sont représentés dans le tableau N°16.

Tableau N°16: Résultats de chimiotaxonomie de l'isolat **SSB₂**

Constituant cellulaire	Isolat SSB₂
Forme de DAP	LL- DAP
Présence de Glycine	+
Présence de lysine	-
Sucres cellulaires	Aucun sucre
Chimiotype	I

La paroi cellulaire de la souche **SSB₂** contient de l'acide LL-diaminopimélique et de la glycine, indiquant qu'elle possède le type de paroi I (Lechevalier et Lechevalier, 1970). L'hydrolysate cellulaire ne contient aucun sucre caractéristique (Tableau N°16).

D'après ces résultats de la chimiotaxonomie couplés à ceux de l'étude physiologique et biochimique, permettent d'affilier la souche sélectionnée (**SSB₂**) au genre *Streptomyce*.

4- Suivi de la croissance de la souche sélectionnée sur des milieux liquide

➤ Variation du pH

Les résultats de la variation du pH au cours de la croissance de l'isolat **SSB₂** sur les quatre milieux liquide (ISP₂, ISP₅, PELG et M₂) sont rapportés dans le tableau N°17 (cité en annexe N°2) et portés sur la figure N°18.

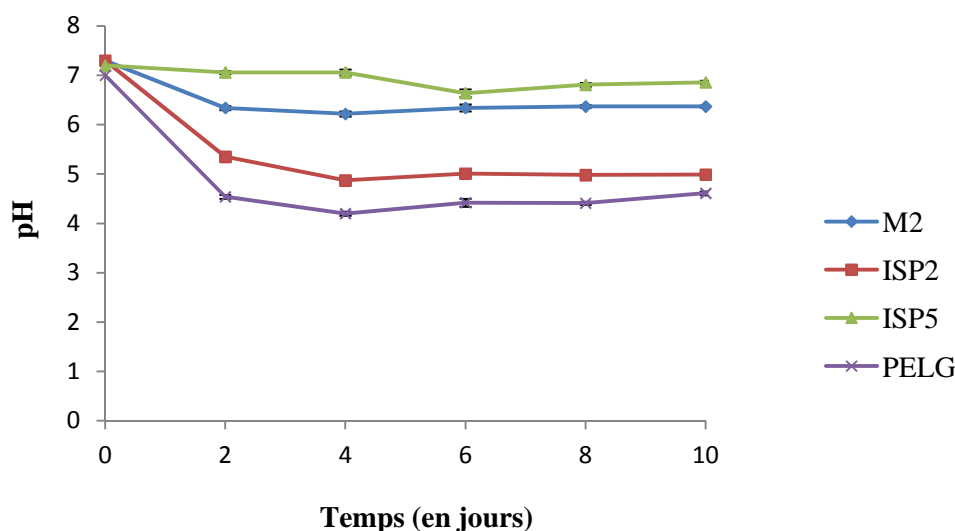


Figure N°18: Variation du pH au cours de la croissance de la souche **SSB₂** sur milieux ISP₂, ISP₅, PELG et M₂

D'après les courbes ci-dessus nous remarquons une diminution du pH sur les quatre milieux liquides au bout du 2^{ème} jour de la fermentation de la souche **SSB₂**.

En effet, du 2^{ème} jour au 4^{ème} jour de l'incubation, le pH a diminué jusqu'à des valeurs de 6,22 ; 4,87 ; 4,2 qui ont été enregistré le 4^{ème} jour de la croissance de la souche **SSB₂** sur respectivement M₂, ISP₂ et PELG, ces valeurs sont considérées comme des minima du pH pour ces milieux.

Pour les milieux M₂, ISP₂ et PELG, au-delà du 4^{ème} jour le pH varié faiblement et reste presque stable jusqu'à la fin de la fermentation. Contrairement au milieu ISP₅ où le pH ne se stabilise qu'au-delà de 8^{ème} jour

La diminution du pH peut être tributaire de l'excrétion et la synthèse des produits acides issus du métabolisme des éléments nutritifs qui rentrent dans la composition des milieux de culture testés, notamment les sources de carbone tels que des sucres, ainsi que dans la majorité des fermentations industriel, la formation de CO₂ et les acides organiques acidifie le milieu (Simon et Meunier,1970).

Par contre, l'augmentation du pH est expliquée par la production des métabolites basiques, telle que l'ammoniac, qui neutralise l'acidité du milieu.

➤ Evaluation de la biomasse

Les résultats de la pesée biomasse mycélienne issue de la croissance de la souche **SSB₂** sur les quatre milieux de culture liquide (ISP₂, ISP₅, PELG et M₂) sont mentionnés dans le tableau N°18 (cité en annexe N°2) et portés sur la figure N°19.

Nous avons remarqué une variabilité de croissance sur les quatre milieux utilisés (M₂, ISP₂, ISP₅ et PELG). La meilleure biomasse a été obtenue sur milieu PELG avec une quantité de 3,10 mg/ml (enregistré le dernier jour de la fermentation) suivie par celle sur milieu M₂ avec une quantité de 3,07 mg/ml qui a été enregistré au 8^{ème} jour de fermentation.

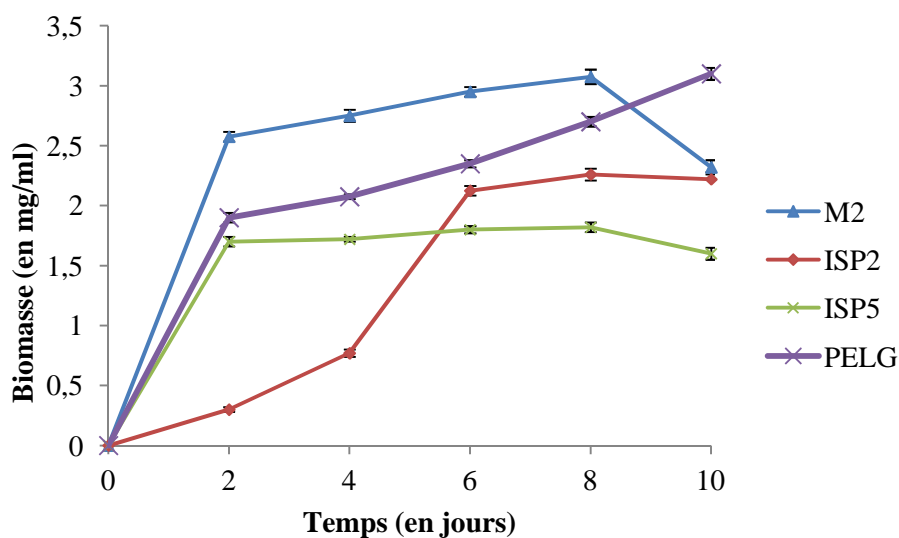


Figure N° 19 : Evolution de la biomasse cellulaire de **SSB₂** sur ISP₂, ISP₅, PELG et M₂

La plus faible quantité de biomasse a été obtenue sur milieu ISP₅ avec un maxima de 1,82 mg/ml le 8^{ème} jour.

L'allure du graphe de la figure N°19 nous renseigne que la phase de latence de **SSB₂** dans les quatre milieux M₂, ISP₂, ISP₅ et PELG est inexistante, elle a été visiblement réduite par l'étape de préculture. Cependant la durée de la phase exponentielle de croissance de notre souche **SSB₂** sur milieux M₂, ISP₂ et ISP₅ est inférieure à 8 jours, elle se divise en deux sous-phases qui sont : la première sous phase d'accélération qui dure du 1^{er} au 6^{ème} jour de la fermentation, et la deuxième sous phase de ralentissement qui débute de 6^{ème} jour jusqu'au 8^{ème} jour d'incubation.

Du 8^{ème} jusqu'au dernier jour de la fermentation, on a remarqué une stabilité de la croissance de l'isolat avant qu'elle ne se termine par une légère diminution de la biomasse qui correspondant au début de la phase stationnaire. Tandis que, pour le milieu PELG cette phase exponentielle apparait en une seule phase qui est la phase d'accélération suite à laquelle la fermentation se termine.

Ces résultats nous mènent à conclure que pour la culture en discontinue, le milieu PELG est meilleur pour la souche **SSB₂** isolée des sédiments de Oued Soummam, suivi par le milieu M₂.

➤ Recherche de l'activité antimicrobienne sur les milieux liquide

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des surnageants de culture des quatre milieux liquide de la fermentation de la souche **SSB₂** a été réalisée par la technique des puits. Elle est représentée sur les planches N°2 et N°3.

Selon les planches N°2 et N°3, il est à noter que la souche **SSB₂** ne présente aucune activité antimicrobienne sur les quatre milieux liquide de culture (M₂, ISP₂, ISP₅ et PELG) contre les souches testées. Des résultats similaires ont été rapportés par plusieurs auteurs qui étudient l'activité antibiotique des souches d'actinomycètes, pour lesquels les activités ont été rapportées uniquement sur milieux solides (**Maruyama et al., 1975; Valan Arasu et al., 2008**).

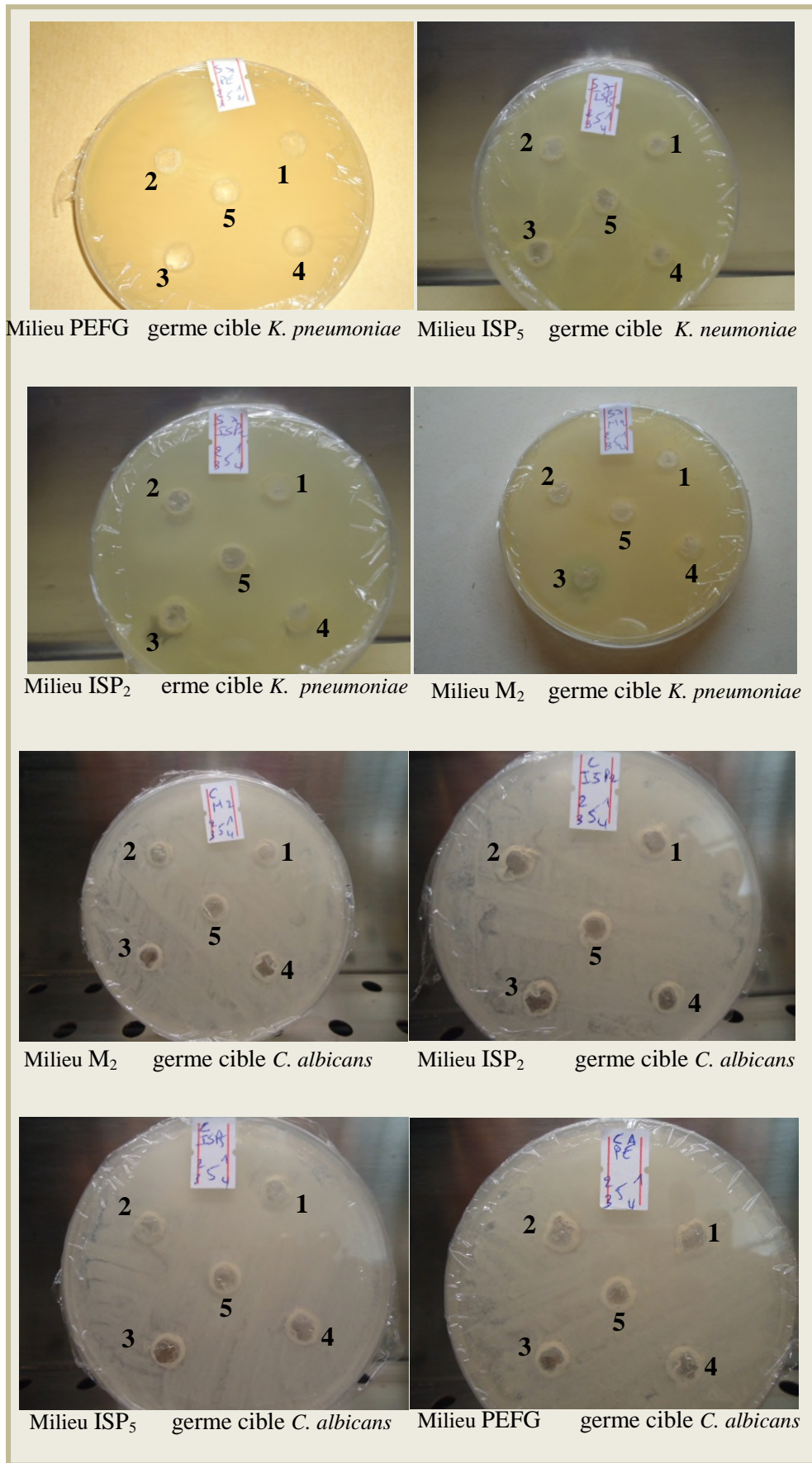


Planche N°2: Test des puits des surnageants de culture de la souche SSB₂.

1, 2, 3, 4 et 5: nombre de prélèvement chaque 48h.

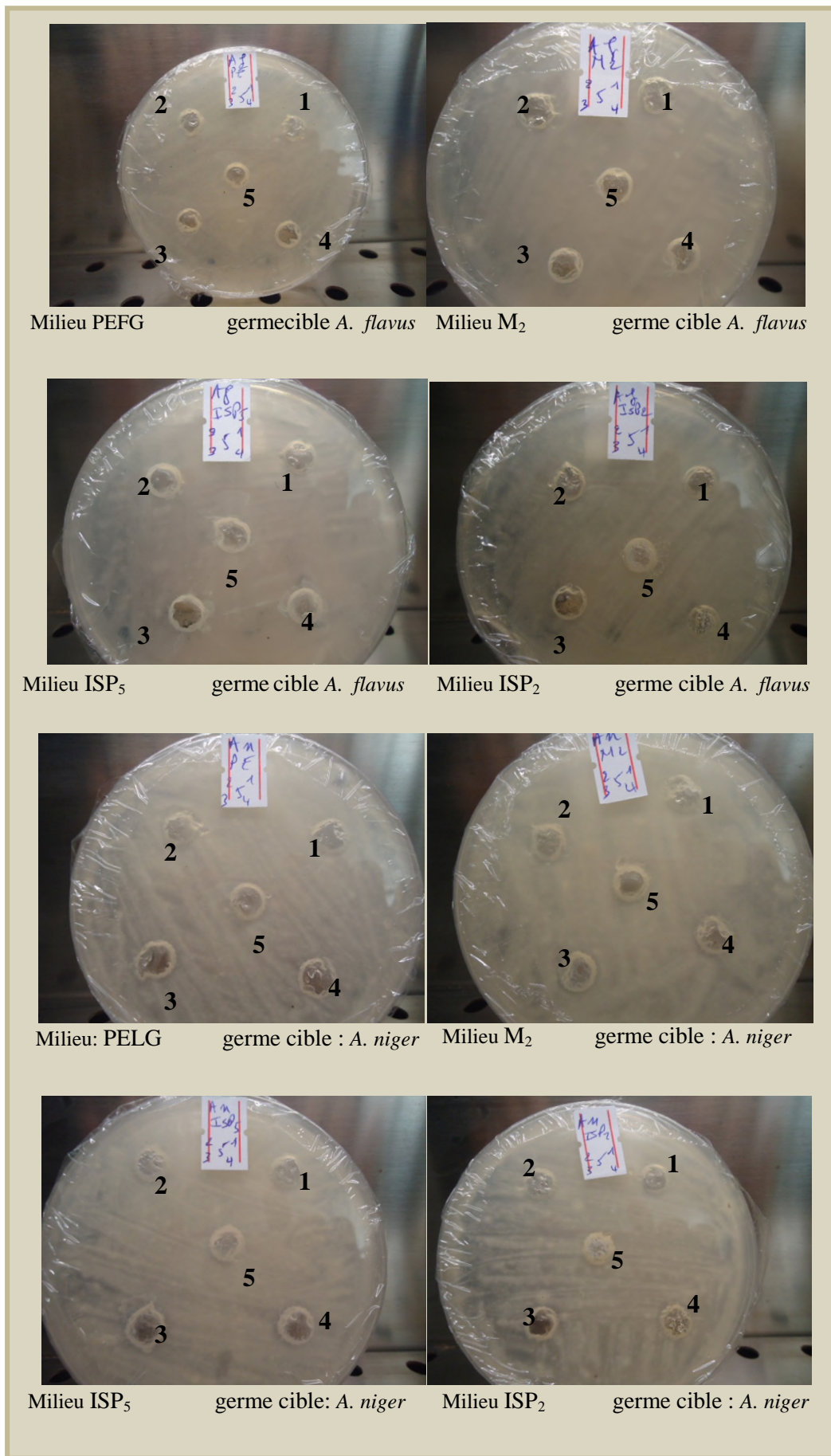


Planche N°3 : Test des puits avec les surnageants de culture liquide de la souche **SSB₂**

1. 2. 3. 4 et 5: nombre de prélèvement chaque 48h.

D'après **Moncheva et al. (2002)** cela peut probablement être dû à l'inadéquation du milieu de culture liquide utilisé pour la production d'antibiotiques. D'autres études ont présenté des résultats comparables. En effet, **Nedialkova et Naidenova, (2005)**; **Singh et al. (2006)** ont observé une réduction voir une absence d'activité en milieu liquide en comparaison avec celle observée par la méthode des cylindres d'agar (en milieu solide).

Shomura et al. (1979); **Iwai et Omura (1982)** ont également remarqué que la production apparente ne se faisait que sur milieux solides et le passage aux milieux liquides pose quelquefois des problèmes quant à la production d'antibiotiques. Ils expliquent cela par le fait que la répartition des nutriments dans les milieux liquides varie avec le temps de fermentation. Alors que, leur distribution autour des colonies poussant sur les milieux solides ne varie pas ou varie très peu.

Shomura et al. (1979) ont noté également une relation étroite entre la morphologie des filaments mycéliens et la productivité. En effet, le mycélium végétatif prend une forme filamenteuse lorsque l'antibiotique est produit en milieu solide, il est cependant fragmenté en milieu liquide et aucune activité antimicrobienne n'est détectée.

Conclusion

La recherche de nouveaux écosystèmes pour l'isolement d'actinomycètes est une voie pour la découverte de nouvelles espèces et par conséquent la découverte de nouveaux produits naturels bioactifs (**Hozzein et al., 2008**).

Les objectifs essentiels de ce travail étaient la mise en évidence de la présence d'actinomycètes dans les sédiments marins et fluviaux de la région de Sidi Ali Lebhar de la ville de Bejaia et la sélection parmi elles de souches à activité(s) antimicrobienne(s).

Une analyse physicochimique des sédiments nous a permis de connaître les caractéristiques et les conditions de croissance des espèces d'actinomycètes dans cet environnement. Ainsi, nous avons pu déterminer que l'échantillon SS (lit de l'Oued Soummam) était de texture argileuse, de pH neutre, peu salé vu sa conductivité, riche en matière organique, mais a le plus faible taux d'humidité par rapport aux sédiments SM et SE. Alors que, les échantillons SM et SE étaient de texture non argileuse, de pH alcalin, ont un taux d'humidité élevé, ils sont ainsi considéré comme sédiment extrêmement salé à taux modéré de matière organique pour le premier (SM) et sédiment très salé à faible taux de la matière organique pour le second (SE).

Parmi les trois milieux de culture utilisés pour l'isolement des actinomycètes (GLM, M₂ et M₃), à partir de trois sédiments (SS, SM et SE), seul le milieu Williams modifié (M₃) a permis l'obtention de 16 souches (isolées de l'échantillon SS) et purifiées car présentant une morphologie caractéristique des actinomycètes.

Après criblage de ces isolats d'actinomycétales par la technique des cylindres d'agar, vis-à-vis de 6 genres bactériens (3 bactéries à Gram +, 3 bactéries à Gram -), une levure et deux moisissures, six isolats codés : **SSB₁**, **SSB₂**, **SSB₃**, **SSB₆**, **SSR₄** et **SSR₆**, ont été sélectionnés pour leurs propriétés antibactériennes et antifongiques.

Seul l'isolat **SSB₂** est doué d'au moins deux activités antibiotiques sur milieu solide qui sont variées : antibactérienne, antifongique et/ou anti-levurienne. Par conséquent, cette souche **SSB₂** a fait l'objet d'une étude phénotypique (morphologique macro et microscopique, biochimique et physiologique) et d'une étude chimio-taxonomique (acide diaminopimélique et sucres) en vue de l'affilier à un germe défini.

La culture de la souche **SSB₂** est caractéristique des bactéries appartenant à la classe des *Actinobacteria*, et l'ordre des *Actinomycetales*. Les colonies de la souche **SSB₂** sont

rondes à contours irréguliers, opaques et de surface poudreuse de différentes couleurs (blanc, beige, crème ou gris). Elle ne produit aucun pigment diffusible sur ISP₇.

L'observation sous microscope optique révèle que la souche **SSB₂** ne possède aucune structure particulière et que les filaments des mycéliums du substrat (MS) sont fragmentés, non cloisonnés et portent des chaînes de spores du type RF (*Rectus-Flexibilis*).

La paroi cellulaire de la souche **SSB₂** contient de l'acide diaminopimélique sous forme LL et l'acide aminé glycine, alors qu'aucun sucre caractéristique n'a été détecté, donc notre souche appartient au Chimiotype I qui contient le genre *Streptomyces*.

Les données chimiotaxonomique et phénotypiques nous permettent d'assigner la souche **SSB₂** au genre *Streptomyces*.

Dans ce travail, nous avons également réalisé des cultures liquides sur quatre milieux (M₂, ISP₂, ISP₅ et PELG) afin de produire des antibiotiques.

Le milieu PELG s'est avéré le plus adapté pour la souche **SSB₂** isolée du sédiment du lit de l'Oued Soummam, suivi par le milieu M₂.

Le passage des milieux solides d'isolement aux milieux liquides de production entraîne la disparition de l'activité antimicrobienne de la souche **SSB₂** sur les quatre milieux liquides (M₂, ISP₂, ISP₅ et PELG) mis en évidence par la technique des puits. Dans ce cas, l'optimisation où le choix d'autres milieux s'impose.

Les perspectives de ce travail sont les suivantes:

- 1) Extraction, purification et identification des substances d'antibiotiques et/ou d'antifongiques produites par les isolats d'actinomycètes sélectionnées.
- 2) Identification des isolats d'actinomycètes sélectionnées par des techniques plus précises notamment le séquençage de génome d'ADNr 16S. Il serait intéressant de pousser l'identification jusqu'au niveau d'espèce.
- 3) Production des substances d'antibiotiques et/ou d'antifongiques sur milieu liquide ou solide par les isolats d'actinomycètes sélectionnées.

Références Bibliographiques

- Altschul S. F., Madden T. L., Schaffer A. A., Zhang J., Zhang Z., Miller W. and Lipman D. J. (1997).** Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* **25**: 3389-3402.
- Angehrn P., Buchmann S., Funk C., Goetschi E., Gmuender H., Hebeisen P., Kostrewa D., Link H., Luebbers T., Masciadri R., Nielsen J., Reindl P., Ricklin F., Schmitt-Hoffmann A. and Theil F.P., (2004).** New antibacterial agents derived from the DNA gyrase inhibitor cyclothialidine. *J. Med. Chem.* **47**:1487-1513.
- Anderson A. S. and Wellington E. M. H., (2001).** The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**: 797-814.
- Anzai K., Nakashima T., Kuwahara N., Suzuki R., Ohfuku Y., Takeshita S., and Ando K. (2008).** Actinomycete Bacteria Isolated from the Sediments at Coastal and Offshore Area of Nagasaki Prefecture, Japan: Diversity and Biological Activity. *Journal of Bioscience And Bioengineering*, **106 (02)**: 215-217.
- Anonyme, (2006).** [http://en.wikipedia.org/wiki/Image:Streptomyces_sp_01.png]
- Asanza-Ternuel M. L., Gontier E., Bienaime C., Nava-Saucedo J.E. and Barbotin J. N., (1977).** Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with K-caragenum immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme and Microbial Technology.* **21**: 314-320.
- Athalye M., Goodfellow M., Lacey J. et White R.P., (1985).** Numerical classification of Actinomadura and Nocardiopsis. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **35**, 86-98.
- Basilio A., Gonzalez I., Vicente M. F., Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A. and O. Genilloud O., (2003).** Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl Microbiol.*, **95**: 814-823.
- Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E. and Lechevalier H. A., (1964).** Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of wholecell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, **12**: 421 – 423.

- Benimeli C.S., Amoroso M.J., Chaile A.P. and Castro G.R., (2003).** Isolation of four aquatic streptomycetes strains capable of growth on organochlorine pesticides. *Bioresource Technology*, **89**: 133-138.
- Beppu T., (1986).** Regulatory substances and genes for differentiation and antibiotic synthesis in actinomycetes. In: *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of actinomycetes*. Eds: G. Szabo, S.Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest. pp.15-23.
- Beppu T., (1992).** Secondary metabolites as chemical signals for cellular differentiation. *Genes*. **115** : 159-165.
- Berdy J., (1974).** Recent developments of antibiotic research and classification of antibiotics according to chemical structure. *Adv. Appl. Microbiol.*, **18**: 309-406.
- Berdy J., (2005).** Bioactive microbial metabolites. *Journal of antibiotics*. **58**: 1-26.
- Betina V., (1965).** Paper chromatography of antibiotics. In "chromatographic reviews. Progress in chromatography, electrophoresis and related methods." Lederer M. Ed. pp 121-166.
- Bockle B., Galunsky B. and Muller R., (1995).** Characterisation of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces pactum* DMS 40530. *Appl. Environ. Microbiol*, **61**: 3705-3710.
- Boiron P., Provost F. et Dupont B., (1993).** Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur, Collection "Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur", Paris. 180p.
- Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., Zerizer H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. and Boiron P., (2005).** Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south east Algeria (Biskra, EL-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *Journal de Mycologie Médicale*, **15**: 39-44.
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. et Boulahrouf A., (2005).** Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhah de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C*.**23**:5-10.

- Bressolier P., Letourneau F., Urdaci M. and Verneuil B., (1999).** Purification and characterization of a keratinolytic serine proteinase from *Streptomyces albidoflavus*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 2570-2576.
- Breton A., Theilleux J. et Sanglier J.J., (1989).** Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In : « Biotechnologie des antibiotiques » Larpent J.P. et Sanglier J.J. (Eds). Paris, Masson. pp. 33-70.
- Cavalla M. et Eberlinberlin T., (1994).** Isolement des Streptomycetes du sol. *L'opéron*, **XIX**, 13-17.
- Chater K.F. et Merrick M. J., (1979).** Streptomycetes in: *Developmental Biology of prokaryotes*. Ed: J.H. PARISH. University of California press, Berkeley and Los Angeles. pp. 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.
- Collin M.D., Pirouz T., Goodfellow M. and Minnikin D.E., (1977).** Distribution of menaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *Gen. Microbiol.* **100** : 221-230.
- Courvalin P. et Trieu-Cuot P., (1990).** Plasmides et transposons de résistance aux antibiotiques. In : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences. Flammarion. France. Ch **13**: 316-325.
- 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. and Solomon N.A., (1985).** Biology of industrial microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. pp 291-357.
- Devereux R., He S.H., Doyle C.L., Orkland S., Stahl D.A., Le Gall J., and Whitman W.B., (1990).** Diversity and origin of *Desulfobivrio specis*: phylogenic definition of a family. *J. Bacteriol.*, 3609-3619.
- Duthoit F., (2010).** Les micro-organismes des sédiments marins profonds, Géosciences, N°11, juillet 2010 : 66-71

- Ensign J. C., (1978).** Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol.* **32**:185 – 219.
- Ensign J. C., Normand P., Burden J. P. and Yallop C. A., (1993).** Physiology of some actinomycete genera. *Res. Microbiol.* **144**: 657-660.
- Eunice J. A. and Prosser J. I., (1983).** Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor*. A3(2) on solid medium. *J. gen. Microbiol.* **129** : 2029 – 2036.
- Garrity G.M., Cole J. R., Harrison S. H., Euzéby J., Tindall B. J. et Lilburn T.G., (2007).** Taxonomic Outline of the the Bacteria and Archaea, Release 7.7 March 6, 2007. Part 10 – The Bacteria: Phylum “Actinobacteria”: Class Actinobacteria. In :Bergey’s Manual of Systematic Bacteriology. Springer-Verlag. New York.
- Genné D., Siegrist H. H., (2003).** De l’antibiogramme à la prescription d’un antibiotique. *Forum Med Suisse.* **20**; 464-468.
- Gersch D., Roemer W., Bocker H. et Thrum H., (1978).** Variations in cyclic adenosine 3',5'- monophosphate and cyclic guanosine 3',5'-monophosphate in antibiotic producing strains of *Streptomyces hygroscopicus*. *Federation of European Microbiological Societies. Microbiological Letters.* **3**: 39-41.
- Goodfellow M., (1971).** Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen Microbiol.*, **69** : 33-90.
- Goodfellow M. (1985).** Actinomycetes systematic: present and future prospects. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes Biology. Szabo G., Biro S. and Goodfellow M (Eds.). 487-496.
- Goodfellow M., Huang Y., Cui Q., Wang L., Rodriguez C., Quintana E., and Liu Z., (2004).** *Streptacidiphilus jiangxiensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from acidic rhizosphere soil in China. *Antonie van Leeuwenhoek* , **86**: 159-165.
- Gordon R. E. and Smith M. M., (1953).** Rapidly growing, acid fast bacteria I. Species descriptions of *Mycobacterium phlei*. *J. Bacteriol.*, **66**: 41-48.
- Gottlieb D. (1973).** General consideration and implication of the actinomycetales. In: Actinomycetales characteristics and practical importance. Eds: G. Sykes and F.A. Skinner. Academic press, London, New York.

- Grafe U., Eritt I. et Fleck W.F., (1984).** On the role of A-factor in cytodifferentiation of anthracycline producing strains of *streptomyces griseus*. *Actinom.* **18**: 220-246.
- Guiraud J. P., (1998).** Techniques d'analyses microbiologiques. *In: Microbiologie alimentaire.* Dunod, paris. pp 168-333.
- 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.
- Hozzein W.N.A., Ali. M.I. and Rabie. W., (2008).** A new preferential medium for enumeration and isolation of desert actinomycetes. *World. J. Microbiol. Biotechnol,* **24** : 1547–1552.
- Hu H. and Ochi K., (2001).** Novel approach for improving the productivity of antibiotic-producing strains by including combined resistant mutations. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 1885-1892.
- Hwang B. K., Lim S. W., Kim B. S., Lee J. Y. and Moon S.S., (2001).** Isolation and in vivo and in vitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67** : 3730-3745.
- Imada, C., (2004).** Enzyme inhibitors and other bioactive compounds from marine actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **87**, 59-63.
- Imada C.,Koseki N., Kamata M., Kobayashi T. et Hamada-Sato N.(2007).** Isolation and characterization of antibacterial substances produced by marine actinomycetes in the presence of seawater. *Actinomycetologica*, **21(1)**, 27-31.
- Iwai Y., and Omura S., (1982).** Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiot.*, **35** (2), 123-141.
- Kallmeyer J., Pockalmy R., and D'Hondt S. (2009)** – Quantifying global subseafloor microbial abundance: method and implications. Goldschmidt Conference Abstracts, A615.Conference.
- Katsifas E. A., Giannoutsou E. P. and Karagouni A.D.,(1999).** Diversity of streptomycetes among specific Greek terrestrial ecosystems.*Let. Appl. Microbiol.*,**29**: 48-51.

- Khokhlov A.S., (1986).** Actinomycete autoregulators. In: Biological, biochemical and biomedical aspects of actinomycetes. Eds : G. Szabo S. Biro M. Goodfellow. Akademiai kiado, Budapest, pp 791-798.
- Kitouni M., (2007).** Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'Etat. Université Mentouri-Constantine. 176p.
- Lacey J., (1973).** Actinomycetes in soils, composts and foddors. In: Actinomycetales: characteristics and practical importance. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York. pp 231-251.
- Lacey J., (1997).** Actinomycetes in composts. *Ann. Agr. Env. Med.* **4**: 113-121.
- Lakshmipathy D.T. and Krishnan K., (2009).** A report on the antidermatophytic activity of Actinomycetes. *International Journal of Integrative Biology.* **6**: 132-136.
- Lamari L., (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 153p.
- Larpent J. P. et Larpent-Gourgaud M., (1990).** Mémento Techniques de Microbiologie. TEC & Doc-Lavoisier. France.
- Larpent J. P. et Sanglier J. J., (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson. Paris.
- Le Minor L., Véron M., (1990).** Bactériologie médicale. Médecine-Sciences Flammarion. France.
- Lechevalier M. P. et Lechevalier H. A., (1970).** Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: The actinomycetales.* Prauser H.(eds) Jemu F. V. 311-316
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P., (1970b).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales.* Prauser H.(Eds).G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- Lechevalier M. P., De Bievre C. and Lechevalier H. A., (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : Phospholipid composition. *Bioch. Syst. Ecol.* **5** : 249-260.

- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A., (1980).** The chemotaxonomy of actinomycetes. In: microbiology thayer,.Actinomycete taxonomy. Eds: A. DIETZ, D.W. Society for industrial SIM special publication number 6. Arlington, Virginia USA. pp 225-291.
- 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. pp 315-360.
- Lechevalier M.P., Prauser H., Labeda D.P and Ruan J.S., (1986).** Two new genera of nocardioform actinomycetes: *Amycolata* gen. nov. and *Amycolatopsis* gen. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **36**, 29-37.
- Leclerc H., Meyer A. et Deiana J., (1986).** Cours de microbiologie générale. *Doin éditeurs.* Paris.
- Lee J. Y. and Hwang B. K., (2002).** Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* **48**: 407-17.
- Leveau J.Y. et Buix M., (1993).** Les Actinomycètes. In. : Les microorganismes d'intérêt industriel. Ed : Florent J. Edition Tec et Doc. Lavoisier Apria. pp 424-480.
- Long P. F. and Wildman H. G., (1993).** Strategy for the use of pretreatments in the isolation of non-streptomycete actinomycetes from soil. *Actinomycetes.* **4**: 59-64.
- Lopes A., Coelho R. R, Meirelles M. N. I., Branquinha M. H., and Vermalho A. B., (1999).** Extracellular serine-proteinases isolated from *Streptomyces alboniger*: Partial characterization and effect of aprotinin on cellular structure. *Men. Inst. Oswaldo. Cruz, Rio de Janeiro.* **94**: 763-770.
- Loucif K., (2011).** Recherche de substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. caractérisation préliminaire de molécules bioactives, Mémoire de Magister en microbiologie. Université Mentouri-Constantine. 117p.
- Mariat F. et Sebald M., (1990).** « Les actinomycetes. » Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.
- Martín J.F. and Demain A.L., (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiology Reviews.* **44**: 230-251

- Martin J.E., (1992).** Clusters of genes for biosynthesis of antibiotics: regulatory genes and overproduction of pharmaceuticals. *J. Indus. Microbiol.*, **9**: 73-90.
- Maruyama. H.B., Suhara. Y., Suzuki-Watanabe, Maeshima. Y. and Shimizu M., (1975).** A new antibiotic, fumaramidmycin I- Production, biological properties and characterization of producer strain. *J. Antibiot*, **28**: 636.
- Mellouli. L., Karray-Rebai. I., Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R. and Naili-Bejar B.S., (2004).** Efficient Transformation Procedure of a Newly Isolated Streptomyces sp.TN58 Strain Producing Antibacterial Activities. *Current Microbiology*. **49**: 400–406.
- Memobio, (2012):** http://www.memobio.fr/html/bact/ba_an_atb.html
- Mincer T.J., Jensen P.R.,Kauffman C.A. et Fenical W.(2002).** Widespread and persistent population of major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, **68(10)**: 5005-5011.
- Minnikin. D.E., Patel. P.V., Alshamaony. L., and Goodfellow M., (1977).** Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, **27**: 104-117.
- Mocheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002).** Characteristics of actinomycetes from Antarctica *J. Cult.Collect.* **3**:3-4.
- Moore B. S., Trischman J. A., Seng D., Kho D., Jensen P. R. and Fenical W. S., (1999).** Antiinflammatory Depsipeptides from a marine Streptomyces. *J.Org. Chem.* **64**: 1145-1150.
- Narayana K.J.P., Prabhakar P., Vijayalakshmi M., Venkateswarlu Y. et Krishna P.S.J., (2008).** Study on bioactive compounds from *Streptomyces* sp. ANU 6277. *Polish Journal of Microbiology*, **57(1)**: 35-39.
- Nedialkova. D., and Naidenova. M., (2005).** Screening the antimicrobial activity of actinomycetes strains isolated from Antarctica. *Journal of Culture Collections*, **4**: 29-35.

- Okami Y. and Hotta K., (1988).** Search and discovery of new antibiotic in: **M. Goodfellow,** S.T. Williams and M. Mordanski (eds) Actinomycetes in biotechnology. *Academic Press*, London. pp. 33 – 67.
- Okazaki T., (2006).** Intrigued by actinomycete diversity. *Actinimycetologica*, **20 (1):** 15-22.
- Omura S., (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer Verlag, New York. Inc. pp 281-303.
- Oren. A., (2002).** Organic compatible solutes. pp 279- 305 *in* Halophilic Microorganisms and their environnements, Cellular origin and life in extreme habitats. V. 5, Klower Academic Publisher, pp 595.
- Oskay M., Tamer A. U. and Azeri C., (2004).** Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afric. J. Biotechnol.* **3(9):** 441-446.
- Petrosyan P., Gacia-varela M., Madrigal A., Huitron C. and Flores M.E., (2003).** *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53:** 269-273.
- Pizzul L., (2006).** Degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d’Uppsala (Suède). 39p.
- Pochon J. et Tardieux P., (1962).** Techniques d’analyse en microbiologie du sol. Edition de la tourelle, St. Mandé. pp. 110-111.
- Porter J.N., (1971).** Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Adv. Appl. Microbiol.* **14 :** 73-92.
- Prescott L. M., Harley J.P. et Klein .D.A., (2003).** Microbiologie. De Boeck & Larcier. France
- Prescott L.M., Harley J.P., and Klein D.A., (2007).** Microbiologie. *Edition De Boeck*
- Reponen T.A., Gazenko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K. and Cole E.C. (1998).** Characteristics of airborne actinomycetes spores. *Appl. Environm. Microbiol.* **64,** 3807-3812.

- Roussel E., Cambon-Bonavita M.-A., Querellou J., Cragg B.-A., Webster G., Prieur D., and Parkes JR., (2008):** Extending the sub-sea-floor biosphere. *Science* **320**: 1046
- Sanasam S. and Ningthoujam D.S., (2010).** Screening of local actinomycete isolated in manipur for anticandidal activity. *Asian Journal of Biotechnology*. **2**: 139-145.
- Sanchez L. and Barana A. F., (1996).** Cell density influences antibiotic biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **142**, 1209-1220.
- Sanglier J.J., Wellington E.M.H., Kamoun A., Kelly C., Mercer D.K., Prinzis S. and Trigo C., (1993).** Novel bioactive compounds from Actinomycetes. *Res. Microbiol.* **144**: 661-663.
- 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).
- Schofield G.M. and Schaal K.P., (1981).** A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* **121** : 237-259.
- 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., Inouye S. and Niida T., (1979).** Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy, and morphology-productivity relationship of *Streptomyces Halstedii*, strain SF-1993. *J. Antibio*, **32 (5)**: 427-435.
- Simon P. et Meunier R., (1970).** Microbiologie industrielle et genie biochimique. Masson ETC editions. France.
- Singh S.L., Baruah I. et Bora T.C., (2006).** Actinomycetes of lake Loktata habitat: isolation and screening for antimicrobial activities. *Biotechnology*, **5 (2)**, 217-221.
- Smaoui S., (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat d'Etat. Institut National Polytechnique de Toulouse (INP Toulouse). 207p.

- 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 *Thermoactinomyces* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS. Microbiol. Lett.* **202**: 97-102.
- Srivibool R., Kurakami K., Sukchotiratana M., and Tokuyama S., (2004).** Coastal Soil Actinomycetes: Thermotolerant Strains Producing *N*-Acylamino Acid Racemase. *Science. Asia.*, **30**: 123-126.
- Srivibool R. and Sukchotiratana M., (2006).** Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakarin J. Sci. Technol.*, **28**:493-499.
- Stackbrandt E. and Geobel B. M., (1994).** Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic of Bacteriology.* **44**: 846-9.
- Staneck J.L. and Roberts G.D., (1974).** Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl. Microbiol.* **28(2)**: 226-231.
- Strub C. (2008).** Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France. 174p.
- Suthindhiran K. et Kannabiran K. (2009).** Hemolytic activity of *Streptomyces* VITSDK1 spp. isolated from marine sediments in Southern India. *Journal de Mycologie Médicale* **19** : 77—86
- Suutari M., Lignell U., Hyvarinen A. and Nevalailen A. (2002).** Media for cultivation of indoor streptomycetes. *J. Microbiol. Meth.* 1668-1674.
- Sykes G. and Skinner F.A., (1973).** Actinomycetales: Characteristics and practical importance. *Academic press.* London. New York.
- Theilleux J., (1993).** Les actinomycètes in microbiologie industrielle : les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y. et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Aprai, **612**: 425pp.

- Valan Arasu M., Duraipandiyan V., Agastian P. and Ignacimuthu S., (2008).** Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *Journal de Mycologie Médicale*. **18** : 147-153.
- Vitalis S., Vallu G., Bekesi I., Szeszak F. and Szabo G., (1986).** Effect of factor C on the differentiation of *streptomyces griseus*. In: Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes. Eds : G.Szabo, S. Biro, M. Goodfellow. Akademiai kiad, Budapest. pp 799-806.
- Williams S.T. and Fleming I., (1989).** Spectroscopic methods in organic chemistry. 4th ed, Mc Graw Hill book company, London, 264p.
- Williams S. T. and Cross T., (1971).** Actinomycetes. In: Methods in microbiology. *Booth C. Ed., Academic Press, London*. **4**: 295-334.
- Williams S. T., Locci R., Beswick A., Kurtboke D. I., Kuznetsov V. D., Le Monnier F. J., Long P. F., Maycroft K. A., palma R. A., Petrolini B., Quaroni S., Todd J.I. and West.M. (1993).** Detection and identification of novel actinomycetes. *Microbiol.* **144**, 653-656.
- Witt D., and Stackebrandt E., (1990).** Unification of the genera *Streptoverticillium* and *Streptomyces*, and amendment of *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943, 339^{AL}. *Systematic and applied microbiology*, **13 (4)**: 361
- Whitman W.B., Coleman D.C. et Wiebe W.J., (1998).** Prokaryotes: The unseen majority. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**: 6578-6583.
- 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.
- 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 de Magistère, Université Mentouri Constantine. 123p.
- Zitouni A., (2005).** Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardioopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives secrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat Université Mouloud MAMMERI de Tizi Ouzou. 231p.

Annexes

1- Réactifs et Milieux de cultures (Kitouni, 2007 et Zermane 2008)

➤ Gélose à l'extrait de levure-Extrait de Malt (GLM)

Extrait de levure	3 g
Extrait de Malt	3 g
Peptone	5 g
Glucose.....	10 g
Agar	20 g
Eau distillé qsp.....	1000 ml
pH = 7,2	

➤ Milieu WILLIAMS Modifié (M₃)

Amidon	10g
caséine.....	0,3g
glucose	1g
Agar	15g
Eau de mer stérile.....	1000ml
pH =7,2	

➤ Milieu WILLIAMS (M₂)

Amidon	10g
caséine.....	0,3g
glucose	1g
KNO ₃	2g
NaCl	2g
K ₂ HPO ₄	2g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,05g
CaCO ₃	0,02g
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,01g
Agar	15g
Eau distillée qsp.....	1000ml
pH =7,2.	

➤ Milieu ISP 5

Glycérol	10 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Solution saline1	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH = 7,0 – 7,4	

➤ Milieu Mueller-Hinton

Infusion de viande	300 g
Hydrolysate de caséine	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar	17 g
pH = 7,4	

➤ Milieu potato Dextrose d'agar (PDA)

Glucose.....	20g
Pomme de terre.....	200g
Agar	15 g
Eau distillée qsp	1000 ml

➤ Milieu Peptone à Extrait de Levure et Glucose (PELG)

Peptone.....	5g
Glucose	10g
Extrait de levure	2g
Agar	20g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 6,8 - 7	

➤ Milieu ISP 2

Extrait de levure	4g
Extrait de malt	10g
D-Glucose.....	4g
Agar	20g
Eau distillé qsp.....	1000 ml
pH = 7,3	

➤ Milieu Amidon-caséine-agar

Amidon soluble	10 g
Caséine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH = 7-7,5	

➤ **Milieu ISP 7**

Glycérol	15 g
L-asparagine	1 g
K ₂ HPO ₄	0,5 g
NaCl	0,5 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,01 g
Agar	20 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH = 7,2-7,4	

➤ **Milieu ISP 9**

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄	5,65 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	1 g
Solution saline2	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH = 6,8-7,0	

➤ **Mannitol-Mobilité**

Peptone	20 g
Nitrate de potassium	1 g
Mannitol	2 g
Rouge de phénol	40mg
Agar	4 g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 8,1	

➤ **Milieu Glucose –extrait de levure-peptone (GLP)**

Glucose	3 g
Extrait de levure	5 g
Peptone	5 g
CaCO ₃	7,5 g
Agar	15 g
Eau distillée qsp.....	1000 ml
pH = 7	

➤ **Gélose nutritive (GN)**

Peptone	10 g
Extrait de levure.....	5 g
NaCl	5 g
Agar	15g
Eau distillée qsp	1000 ml
pH = 7,2	

➤ **Solution saline1**

FeSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
MnCl ₂ .4H ₂ O	0,1 g
ZnSO ₄ .7H ₂ O.....	0,1 g
Eau distillée qsp	100 ml

➤ **Solution saline2**

CuSO ₄ . 5H ₂ O	0,64 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	0,11 g
MnCl ₂ . 4 H ₂ O	0,79 g
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	0,15 g
Eau distillée qsp.....	100 ml

N.B : L'ajustement des pH des milieux de cultures s'effectue à l'aide d'une solution de NaOH 1N ou une solution d'HCl 1N selon le cas.

2-Résultats des tests d'activité antimicrobienne et suivi de fermentation

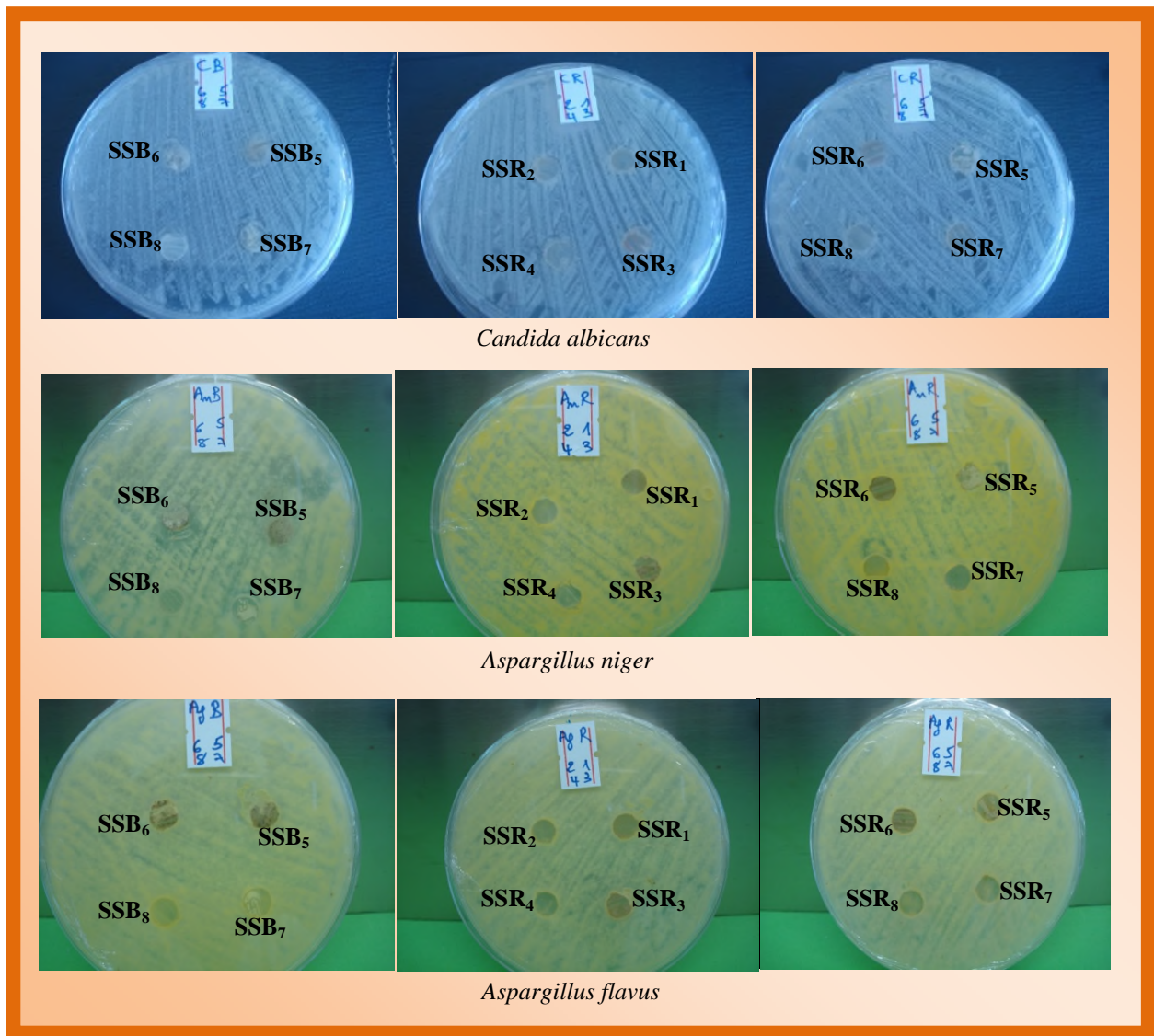


Planche N° 4: Test d'activité des souches actinomycétales vis-à-vis des souches fongiques.

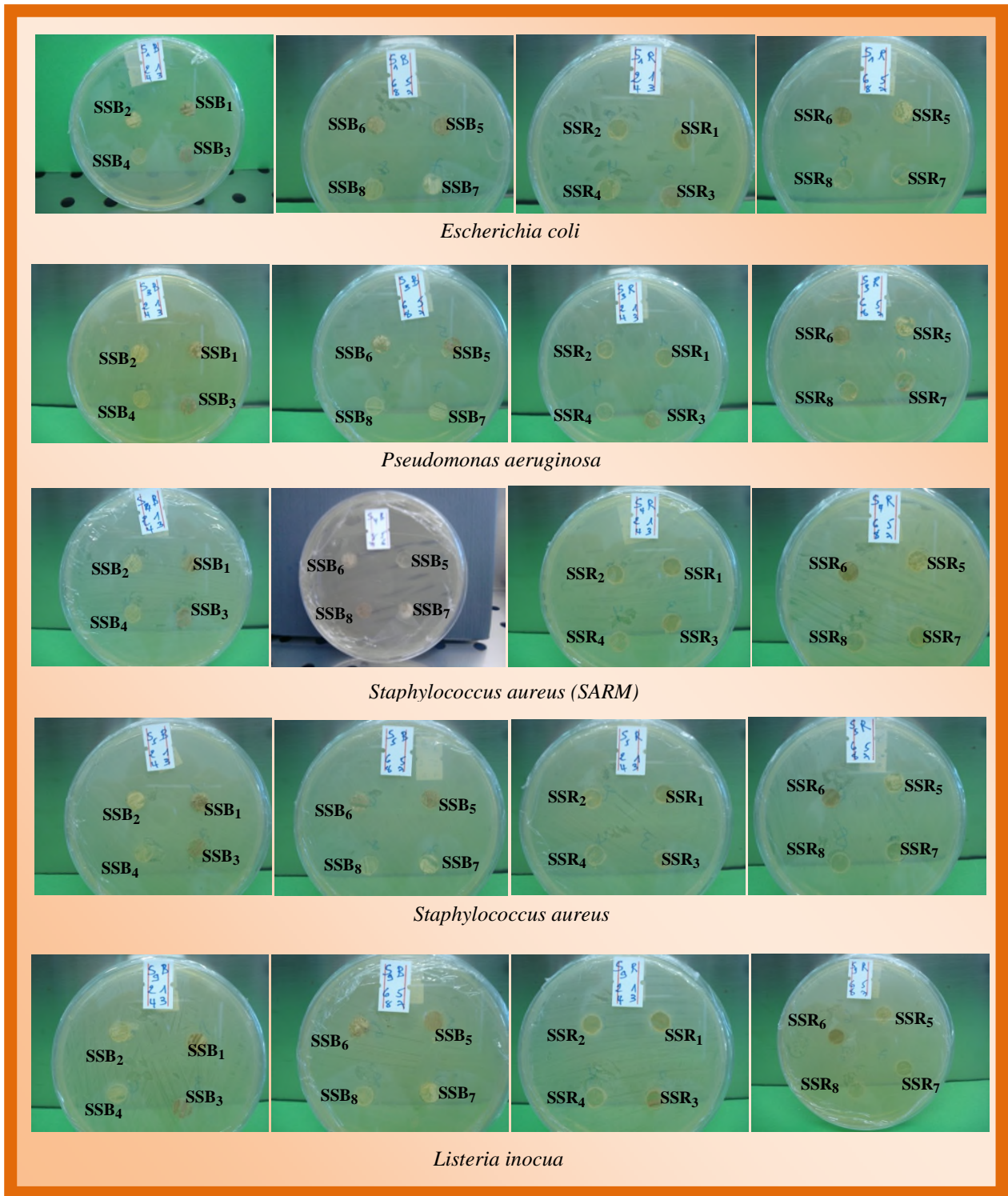


Planche N° 5: Test d'activité des isolats actinomycétales vis-à-vis des souches bactériennes.

Tableau N°17 : Variation du pH au cours de la croissance de la souche **SSB₂** sur ISP₂, ISP₅, PELG et M₂.

Temps (jours)	M ₂	ISP ₂	ISP ₅	PELG
0	7,3	7,3	7,2	7
2	6,34± 0,04	5,35 ± 0,02	7,06 ± 0,03	4,54 ± 0,04
4	6,22± 0,05	4,87 ± 0,04	7,06 ± 0,06	4,2 ± 0,04
6	6,34± 0,07	5,01 ± 0,06	6,64 ± 0,08	4,42 ± 0,08
8	6,37± 0,03	4,98 ± 0,02	6,81 ± 0,04	4,41 ± 0,03
10	6,37± 0,02	4,99 ± 0,04	6,86 ± 0,03	4,61 ± 0,04

Tableau N°18 : Evolution de la biomasse de **SSB₂** sur ISP₂, ISP₅, PELG et M₂

Temps (jours)	M ₂ (mg/ml)	ISP ₂ (mg/ml)	ISP ₅ (mg/ml)	PELG (mg/ml)
0	-	-	-	-
2	2,575 ± 0,04	0,3 ± 0,02	1,7 ± 0,03	1,9 ± 0,04
4	2,75 ± 0,05	0,77 ± 0,03	1,72 ± 0,06	2,075 ± 0,02
6	2,95 ± 0,04	2,125± 0,04	1,8 ± 0,04	2,35 ± 0,03
8	3,075 ± 0,06	2,26± 0,05	1,82 ± 0,06	2,7 ± 0,04
10	2,32 ± 0,06	2,22± 0,06	1,6 ± 0,04	3,1 ± 0,05

Résumé:

Des échantillons de sédiments marins (SM) et fluviaux de l'Oued Soummam (SE et SS) ont été réalisés au niveau de la région de Sidi Ali lebhar commune de Bejaia. L'étude des propriétés physicochimiques de ceux-ci a montré que l'échantillon SS est un sédiment de nature argileuse, neutre, peu salé et à taux de matière organique très élevé. Alors que, les échantillons SM et SE sont des sédiments non argileux, alcalins, avec des taux modéré (SM) et faible (SE) de matière organique, l'échantillon SM peut être considéré comme un sol extrêmement salé et l'échantillon SE comme sol très salé. Le milieu Williams modifié (M_3) a permis d'isoler 16 souches d'actinomycètes à partir de l'échantillon du sédiment fluvial (SS). L'activité antimicrobienne a été testée vis-à-vis de trois bactéries Gram positives et trois bactéries Gram négatives, une levure et deux champignons filamenteux, par la technique des cylindres d'agar. Parmi ces isolats, 06 souches ont montré une activité contre au moins un germe-test étudié. L'isolat SSB_2 est doué d'une activité antibactérienne, d'activités antifongiques et antilevurienne. Celle-ci a fait objet d'une étude morphologique (aspect microscopique et macroscopique), physiologique, biochimique et chimiotaxonomique en vue de son identification. Cela nous a permis d'affilier cette souche au genre *Streptomyces*. L'activité antimicrobienne réalisée par la technique des puits pour la souche SSB_2 n'a pas été retrouvée sur les quatre milieux liquides utilisés à savoir: M_2 , ISP_2 , ISP_5 et PELG. Les résultats de la culture en discontinue sur ces mêmes milieux nous a permis de conclure que le milieu PELG est le milieu adapté pour la croissance de la souche SSB_2 .

Mots clés : Actinomycètes, *Streptomyces*, sédiments marins et fluviaux, Activité antibiotique.

Abstract:

Samples of the sea sediment (SM) and fluvial sediment (SE and SS) of Soummam river were realized at Sidi Ali lebhar area, city of Bejaia. Their physicochemical properties indicated that SS sample was clayey, neutral, slightly salty sediment and that having high level of organic matter. Whereas, the samples SM and SE were no clayey, alkaline sediments with moderate (SM) and low (SE) level of organic matter, the sample SM can be considered as extremely salty and the sample SE as very salty soils. Modified Williams media (M_3) allowed isolation of 16 strains of actinomycetes from fluvial sediment sample (SS). Antimicrobial activity was tested against three Gram-positive bacteria and three Gram-negative bacteria, one yeast and two filamentous fungi, using the agar cylinder method. Among these isolates, 06 strains showed an activity against at least one of the germ-tested. The isolate SSB_2 showed antibacterial and antifungal activities. Further way it was submitted to a morphological (microscopic aspect and macroscopic aspect), physiological, biochemical and chimiotaxonomical studies for its identification. That allowed us to affiliate this strain to the *Streptomyces* genera. There was no antimicrobial activity of the strain SSB_2 using the wells technique on four median used: M_2 , ISP_2 , ISP_5 and PELG. The results of the discontinuous culture in the same media permit us to conclude that, the media PELG is adapted for the growth of the strain SSB_2 .

Key words: Actinomycetes, *Streptomyces*, sea and fluvial sediments, antibiotic activity.

ملخص :

أجريت عينات من رواسب البحر (SM) والنهر (SE,SS) من واد الصومام، بمنطقة سيدى علي البحر (بجاية). إن الخصائص الفيزيائية والكيميائية للعينة SS تشير أنه راسب قليل الملوحة، ذو طبيعة طينية، معتدل الحموضة و له نسبة عالية جدا من المواد العضوية. بينما العينة SE و SM هي رواسب ليست من طبيعة طينية، قاعدية الحموضة و نسبة معتدلة (SM) و ضعيفة (SE) من المواد العضوية، تصنف العينة SM على أنها تربة مالحة جدا و العينة SE تربة مالحة. إن استخدام الوسط المعيشي وليامز المعدل (M_3) سمح بعزل 16 سلالة لصنف الاكتينونومسات (actinomycètes) من راسب النهر (SS). و قد تم البحث على القدرة على إنتاج المضادات الحيوية بطرق الانتشار للمضادات الحيوية ضد 03 بكتيريا ايجابية الغرام، 03 بكتيريا سالبة الغرام، خميرة واحدة و 02 فطريات مختلفة. من بين هذه العزلات، 06 سلالات أظهرت قدرتها على تثبيط نمو سلالة بكتيريا واحدة على الأقل. كما أظهرت النتائج أن العزلة SSB_2 لها أنشطة مضادة للجراثيم، للفطريات والخميرة. إن الدراسة المورفولوجية (ظهور العيانية والمجهرية)، الفسيولوجية، الكيميوحيوية وكيميو تصنيفية لهذه العزلة، من أجل إدراجها ضمن صنف معين، سمحت لنا بتصنيفها ضمن صنف *Streptomyces*. لم يتم العثور على نشاط مضادات الميكروبات للسلالة (SSB_2) التي تمت بتقنية الأبار في الأوساط المعشبة السائلة الأربعة المستخدمة: M_2 ، ISP_2 ، ISP_5 و PELG. نتائج تخمير متقطع على نفس الأوساط المعشبة، تظهر أن الوسط المعيشي PELG هو المناسب لسلالة SSB_2 .

كلمات البحث : Actinomycètes , *Streptomyces*، رواسب البحر والنهر ، نشاط المضادات الحيوية.