

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université A. MIRA - Bejaia

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences Biologiques
Option : Génie Biologique



Réf :.....

Mémoire de Fin de Cycle
En vue de l'obtention du diplôme

MASTER

Thème

**Etude de l'activité antagoniste de souches
d'actinobactéries d'origine marine cultivées en
mono et co-culture**

Présenté par :

Abderrahmane Akila et Soula Samira

Soutenu le : 17 Juin 2017

Devant le jury

Mme. NOURI_ SAIDANI karima

MAA

Président(e)

Melle. DJINNI Ibtissem

MCB

Encadreur

Mme. BOUDRIES_ SOUAGUI Samiha

MAA

Examinatrice

Année universitaire : 2016/2017

Dédicaces

J'ai le plaisir de dédier ce modeste travail :

A ceux qui sont mon exemple de réussite, que j'aimés et respecté, qui m'ont donnés de l'amour ; de la tendresse, du soutien et de la force, mes très chers parents, que Dieu vous protège et vous prête tous une longue et heureuse vie, que ce travail soit le témoignage profond de mon amour.

A mes très chers frères Farid, Kamel, Malek et Ghezali qui m'ont soutenu avec leurs encouragements et à qui m'ont mené à cet aboutissement, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde.

A mes très chers sœurs Chafia, Rachida, Kahina et surtout Naima et son mari Farid qui m'ont soutenu sur tous les plans, auxquels je souhaite beaucoup de réussite et tout le bonheur du monde. Qu'ils trouvent dans ce travail la preuve modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond amour.

A mes très chères amies.

Samira



Remerciements

Remerciant tout d'abord Dieu tout puissant de nous avoir donné la force de réaliser ce travail

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude et nos vifs remerciement à notre promotrice Melle DJINNI Ibtissem, qui a accepté de nous encadrer. Nous lui témoignons notre gratitude et notre reconnaissance.

Nous tenons à remercier M^{me} Nouri d'avoir accepté de présider le jury et a M^{me} Boudries d'avoir accepté d'examiner notre travail.

Nous remercions l'ensemble du personnel du laboratoire pour nous avoir permit d'effectuer les différents tests et analyses et pour avoir mis à notre disposition le matériel et les moyens nécessaires à la réalisation de notre travail

Nous tenons à exprimer nos sentiments de reconnaissance à toutes les personnes qui ont participé à ce travail, qui nous ont appris une infinité de choses et qui nous ont aidé, conseillé et soutenu à tout moment afin de réaliser ce travail dans les meilleurs conditions.

Akila & Samira

Dédicaces

Je tiens vivement, à dédier ce modeste travail:

A ceux qui m'ont tout donné sans rien en retour

*A ceux qui m'ont encouragé et soutenu dans les moments les plus difficiles
Et ceux à qui je dois tant*

A mes parents Nourdine et Ghania pour leurs amour et leur soutient continu

A mes frères et sœurs, Yacine, Siham, Tarik, Lounis et Kenza

A tous mes amis, à mes copines de chambre

A toute la promotion Génie Biologique 2016-2017. Merci

Akila

Sommaire

Liste des tableaux	
Liste des figures	
Liste des abréviations	
Introduction.....	1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

I.Généralités sur les actinobactéries.....	3
I-1-Ecologie.....	3
2-Cycle de développement.....	3
II. Importance des actinobactéries.....	4
1- En agronomie.....	4
2. Importance en biotechnologie.....	5
III. Taxonomie et critères d'identification.....	5
1. Taxonomie des actinobctéries.....	5
2. Caractères morphologiques.....	5
2.1. Caractères macromorphologiques.....	5
2.2. Caractères micromorphologiques.....	5
3. Caractères chimiotauxonomiques.....	6
3.1. Composition pariétale en acides aminés, sucres et lipides caractéristiques.....	6
4. Critères physiologiques.....	6
5. Critères moléculaires.....	6
IV. Métabolisme général chez les actinobactéries.....	7
1. Métabolisme primaire.....	7
2. Métabolisme secondaire.....	7
V. Co-culture et production de métabolites secondaires.....	7
1. Effet des interactions par contact cellulaire sur le métabolisme secondaire.....	8
2. Effet des interactions chimiques sur le métabolisme secondaire.....	8
3. Quorum sensing et métabolisme secondaire.....	9

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	11
1. Matériel analytique.....	11

Sommaire

2. Matériel biologique.....	11
2.1. Microorganismes étudiés Actinobactéries.....	11
2.2. Germes cibles utilisés.....	11
II. Méthodes.....	11
1. Etude morphologique des isolats.....	11
1.1. Etude macromorphologique.....	11
1.2. Etude micromorphologique.....	11
2. Etude des caractères physiologiques.....	12
2.1. Production de pigments mélanoides.....	12
2.2. Dégradation des sucres	12
2.3. Croissance à différentes températures.....	12
2.4. Résistance à différentes concentration de NaCl.....	12
2.5. Etude de la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds.....	12
2.6. Croissance à différentes valeurs de pH.....	13
3. Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries.....	13
3.1. Méthode des cylindres d'agar.....	13
3.2. Méthode des puits.....	13
4. Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolatsensemencés en co-culture....	14
4.1. Préparation des suspensions de spores.....	14
4.2. Etude phénotypique.....	14
4.3. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts obtenus par co-culture.....	15

Chapitre III : Résultats et discussion

I. Etude morphologique des isolats.....	16
II. Etude des caractères physiologiques.....	19
1. Dégradation des sucres comme seule source de carbone.....	19
2. Croissance à différentes températures.....	20
3. Résistance à différentes concentration de NaCl.....	20
4. Etude de la résistance aux métaux lourds.....	21
5. Croissance à différentes valeurs de pH.....	22
III .Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries.....	22
1. Méthode des cylindres d'agar.....	22

Sommaire

2. Méthode des puits.....	23
IV .Etude phénotypique des isolats cultivés en co-culture.....	25
1. Activité antagoniste des extraits bruts obtenus par co-culture.....	26
Conclusion générale.....	30
Références bibliographiques	
Annexes	

Liste des tableaux

Tableau N°	Titre	Page
I	Quelques exemples de molécules bioactives produites par fermentation mixte d'actinobactéries.	10
II	Etudes des caractères morphologiques des 6 souches (<i>S1</i> , <i>S3</i> , <i>S5</i> , <i>S6</i> , <i>S12</i> et <i>A1</i>) sur différents milieux.	Annexe III
III	Caractéristiques macromorphologiques des 6 souches après 7 jours d'incubation à 28 °C sur différents milieux de culture.	Annexe III
IV	Dégradation des sucres par les 6 isolats sur milieu ISP9 après 14 jours d'incubation.	19-20
V	Croissance des 6 isolats d'actinobactéries à différentes température après 14 jours d'incubation.	20
VI	Croissance à différentes concentration en NaCl.	21
VII	Résistance ou la sensibilité aux métaux lourds.	21
IX	Croissance à différentes valeurs de pH.	22
X	Activité antagoniste des 6 isolats à l'égard de 5 germes cible	23
XI	Etude des caractères morphologique des isolatsensemencé en co-culture sur milieu MEM50%	26

Figure N°	Titre	Page
1	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.	4
2	Induction de la production d'undécylprodigiosine par <i>T. pulmonis</i> en co-culture avec <i>S. lividans</i> TK23.	8
3	Stimulation de la production d'actinorhodine et du développement aérien de <i>S. coelicolor</i> en réponse à <i>M. xanthus</i> .	9
4	Etude comparative de l'aspect morphologique des 6 souches d'actinobactéries en monoculture et en co-culture sur milieu MEM50%.	14
5	Schéma retraçant les principales étapes de l'ensemencement en co-culture des souches et d'obtention de la mise en évidence des extraits bruts et de la mise en évidence de l'activité antagoniste.	15
6	Observation des isolats d'actinobactéries sur différents milieux ISP après 7 jours d'incubation à 28C°.	17
7	Observation microscopiques des isolats d'actinobactéries après 14 jours d'incubation à 28C° aux deux grossissements (x10).	18
8	Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques des 6 isolats à l'égard de 5 germes cibles.	24
9	Illustration des résultats d'activité antagoniste (test des puits) des 6 isolats vis-à-vis 4 germes cibles.	25
10	Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques à l'égard de germes cibles (co-culture).	27
11	Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques à l'égard de 5 germes cibles (co-culture).	27
12	Illustration des résultats de l'activité antagoniste des combinaisons vis-à-vis 3 germes cibles.	28

A.E : Acétate d'éthyle

AHL : Acyl- Homosérines Lactones

DAP : Diamino Acid pimélic

DAB : 2,4-diaminobutiric Acid

E.coli : *Escherichia coli*

GC%: Pourcentage Guanine –Cytosine

ISP : International *Streptomyces* Project

LMA : Laboratoire de Microbiologie Appliquée

MA : Mycélium aérien

MS : Mycélium du substrat

MEM : Mincer eau de mer

MED : Mincer eau distillé

MH : Mueller Hinton

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

QS : Quorum Sensing

SCA : Starch Casein Agar

La découverte des antibiotiques a réduit le taux de mortalité des maladies infectieuses à une époque où elles étaient l'une des plus grandes menaces auxquelles l'humanité a été confrontée (OMS, 2008). Toutefois, C'est sans compter sur l'apparition des phénomènes de la multirésistance bactérienne ce phénomène alarmant est d'autant plus problématique particulièrement dans les environnements hospitaliers où des bactéries multi-résistantes apparaissent telles que *Staphylococcus aureus*, mais également l'apparition de nouvelles pathologies et l'évolution des maladies infectieuses (telles que le SIDA, le virus Ebola, la maladie du légionnaire... etc) (Demain et Lancini, 2006).

Les océans couvrent environ 70% de la surface de la terre et renferme un éventail de formes de vie, y compris les microorganismes qui survivent à l'environnement complexe de l'océan (Panjwani *et al*, 2015).

Les bactéries en particulier les actinobactéries d'origine marine et plus spécialement le genre *Streptomyces* sont de grands producteurs de molécules actives. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al*, 2005; Smaoui, 2010). Toutefois, plusieurs travaux ont été menés pour augmenter le rendement de production de ces métabolites telles que la méthode statistique (les surfaces de réponses, model composite centré...), mutagénèses, conditions de stress, co-culture...etc.

La co-culture de ces microorganismes permettrait d'augmenter les rendements des métabolites secondaire, ce qui provoque la production d'extraits de co-cultures (Petit, 2009). La concurrence dans les co-cultures peut entraîner l'induction de métabolites secondaires qui ne peuvent être produites pendant la culture indépendante (Oh *et al*, 2005). L'interaction dans la co-culture augmente considérablement la production de métabolite et peut ainsi favoriser notre compréhension de l'interaction microbienne.

La présente étude s'inscrit dans cette optique qui s'organise autour de trois parties : La première partie fait état des connaissances générales sur les actinobactéries, le métabolisme secondaire et les cultures mixtes.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des méthodes expérimentales mises en œuvre dans l'étude des caractères morphologiques, physiologiques et antagonistes de 6 souches d'actinobactéries d'origine marine ainsi que leur potentiel à produire des composés bioactifs en co culture ;

La troisième partie présente et discute les résultats obtenus et la démarche de ce travail consiste :

- 1- Etudes des caractères morphologiques et physiologiques de 6 isolats sur différents milieux de cultures Mincer (50 et 100%) et SCA (50 et 100%).
- 2- La mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries par deux méthodes différentes : méthode de cylindre d'agar et des puits.
- 3- Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats ensemencés en co-culture

I. Généralités sur les actinobactéries

1. Ecologie

Les actinobactéries ont été considérées comme un groupe intermédiaire entre bactéries et champignons. Actuellement, elles sont reconnues comme des organismes procaryotes, présentant des similitudes à la fois avec les bactéries et les moisissures (Andriambololona, 2010). Ainsi, elles sont définies comme des bactéries à Gram positif filamenteuses, ayant un GC% élevé (> 55%) (Newman *et al*, 2002).

La plupart des espèces sont immobiles, hétérotrophes mais certaines sont chimio-autotrophes (Ensign *et al*, 1993), aérobie et mésophiles (Wellington, 1982 ; Googfellow et Williams, 1983). Par ailleurs, elles sont tolérantes des températures avoisinant les 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Omura, 1992).

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels (Larpen et Sanglies, 1989). Elles ont des aptitudes à coloniser de nombreux milieux à partir du sol (air, compost, fourrages, graines, etc ...) (Badji, 2006 ; Perand, 2006). Ces microorganismes sont retrouvés aussi bien en milieu aquatique : dans les lacs, les rivières, les ruisseaux, qu'en milieu marin : les mers, les océans et même dans les sédiments océaniques situés à plus de 400m de profondeur (Weyland, 1986 ; Sabaou, 1988 ; Singh et al, 2007). Par ailleurs, les genres isolés à partir du milieu marin nécessitant de l'eau de mer pour leur croissance, sont désignés d'*actinobactéries* marines. En effet, un grand nombre d'espèces ont été isolées de la mer profonde, un environnement à forte pression, à basse température, absence de lumière, à concentration variable d'oxygène et de sel, preuve d'une vaste distribution de ce groupe de part le monde (Mincer et al, 2002 ; Pissul, 2006).

La plupart des actinobactéries sont capables de former des spores, dotées de capacité de survie dans des conditions extrêmes telles que la salinité, et jouent un rôle important dans la dispersion par le vent et les courants d'eau (Zaitlin et Watson, 2006).

2. Cycle de développement du genre *Streptomyces*

Les actinobactéries ont un cycle de développement complexe (Figure1), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium du substrat (MS) formé d'hyphes qui se ramifient. Le développement du mycélium du substrat (MS) vers la partie superficielle donne le mycélium aérien (MA). Les extrémités des hyphes aériens se différencient pour former des spores qui sont des agents de dissémination (Kim et al, 2004 ; Smaoui, 2010). Ces spores se forment par séptation du mycélium primaire,

habituellement, en réponse à un stress extérieur. La différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique. Un métabolisme secondaire se met en place donnant lieu à la biosynthèse de composés d'une grande diversité de structure et d'activités biologique (Choulet, 2006). Le mycélium du substrat (MS) s'autolyse et les produits de la lyse sont utilisés par le mycélium aérien, c'est à ce moment la que les composés bioactifs sont synthétisés, appelés métabolites secondaire (Smaoui, 2010).

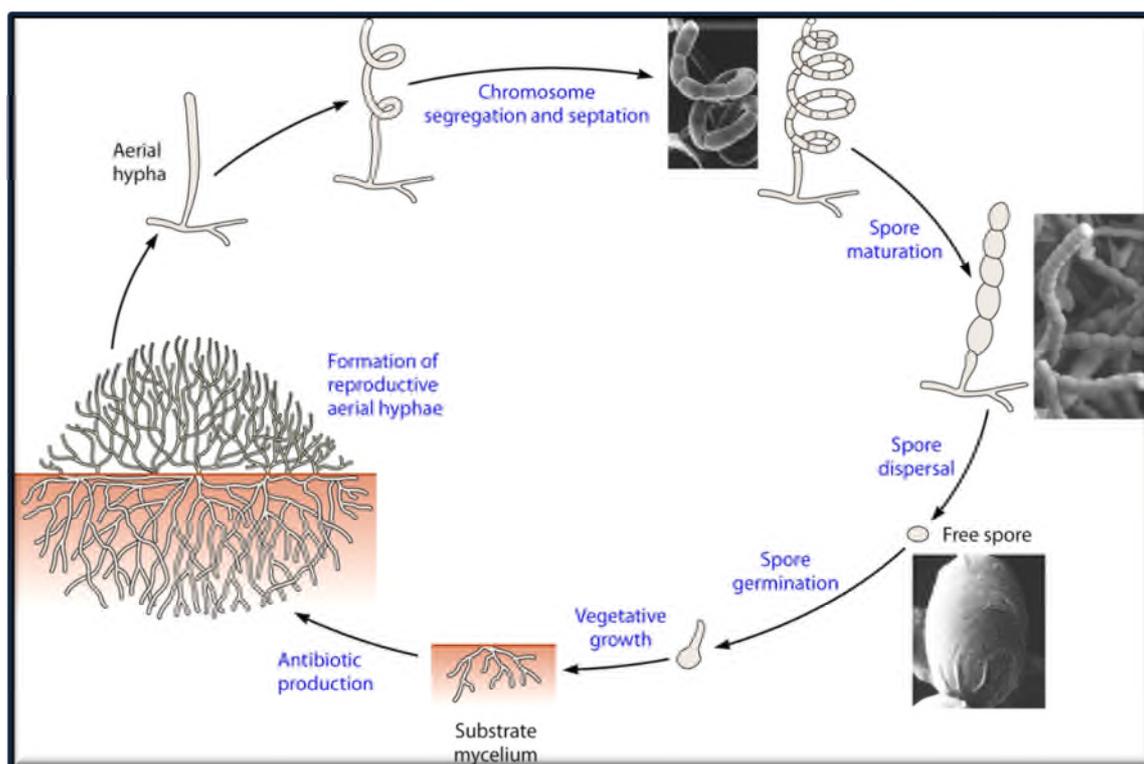


Figure 1 : Cycle de développement du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Jakimowicz, 2007).

II. Importance des actinobactéries

1. Importance en agronomie

Les actinobactéries représentent un pourcentage élevé de la biomasse microbienne du sol. Elles ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique et des éléments minéraux et contribuent ainsi à la fertilisation des sols (Goodfellow et al, 1984).

Le genre *Frankia* est très connu en foresterie pour son rôle dans la fixation d'azote atmosphérique en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres dicotylédones (Lechevalier, 1981).

2. Importance en biotechnologie

L'hétérogénéité biochimique des actinobactéries et leur exceptionnelle capacité à produire des métabolites secondaires font d'eux des producteurs potentiels de nombreuses molécules actives d'intérêt biotechnologique, ayant des applications dans les domaines industriel, pharmaceutique et alimentaire (Abbas, 2006), telles que : les antibiotiques, les herbicides, les pesticides (Parungao *et al*, 2007), des antiparasitaires (Oskay *et al*, 2004) les anti tumoraux (Kim *et al*, 2006) et les enzymes ...

Certaines espèces d'actinobactéries ce sont révélées capables de dégrader ou de transformer des toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et de réduire ainsi leur teneur dans les produits alimentaires (Holzapfel *et al*, 2002) tel que le genre *Rhodococcus* qui produit des enzymes dégradant plusieurs polluants et joue un rôle dans la détoxification des sols contaminés (Kariptas *et al*, 2001).

III. Taxonomie et critères d'identification

1. Taxonomie des actinobctéries

La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs critères : morphologique, chimique, physiologique et moléculaire. L'identification des genres est facilitée par les études morphologique et chimique tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Badji, 2006).

2. Caractères morphologiques

Les caractères morphologiques ont trait aux caractéristiques culturelles et micromorphologiques. Les critères morphologiques sont énoncés dans les Bergey's Manual de 1989 et 1994.

2.1. Caractères macromorphologiques

Les caractères culturels contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinobactéries entre eux. Les caractères importants sont la présence et la couleur du mycélium aérien (MA) et /ou du mycélium du substrat (MS) ainsi que la production de pigments diffusibles dans le milieu de culture.

2.2. Caractères micromorphologiques

Les caractéristiques micromorphologiques englobent la production de spores, aspect de leur surfaces (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue), leur disposition sur les hyphes, leurs mobilités et leurs nombres, mais également la présence ou non de sporophores.

3. Caractères chimiotaxonomiques

La chimiotaxonomie est l'étude de la variation chimique dans les organismes et son utilisation pour la classification et l'identification. Si pour certains genres les caractères morphologiques sont suffisants pour leur reconnaissance, la grande majorité par contre nécessite une étude chimique de leurs constituants cellulaires (Boudjella, 2007).

3.1. Composition pariétale en acides aminés, sucres et lipides caractéristiques

La paroi cellulaire des actinobactéries est composée entre autre de peptidoglycane. Ce dernier peut renfermer soit du DAP (Acide diaminopimelique) ou alors de la lysine, glycine, ornithine ou DAB (Acide 2,4-diaminobutyrique) connus comme la clef de l'analyse chimiotaxonomique (Yuriko *et al*, 2007). D'autre part d'après Lechevalier et Lechevalier (1970), les sucres sont présents sous forme de couples : arabinose-galactose, arabinose-xylose, rhamnose-galactose, et le madurose. Ainsi sur la base des acides aminés et la composition en sucres, cinq chimiotypes sont rencontrés chez les acténobactéries. L'analyse des lipides est largement utilisée dans la systématique bactérienne et l'identification des actinobactéries. En effet, l'étude concerne l'analyse des acides gras à longue chaîne, les ménaquinones et les phospholipides (Cross et Goodfellow, 1973).

4. Critères physiologiques

Les caractères physiologiques permettent de différencier les espèces appartenant à un même genre. Ils font recours à des tests de dégradation de différents composés (glucides, lipides, protéines, polymères complexes, etc), de résistance aux agents antimicrobiens et à divers agents physico-chimiques (pH, température, salinité, etc) et à plusieurs tests enzymatiques.

5. Critères moléculaires

Ces critères ont permis de tracer toute la phylogénie des actinobactéries :

- Hybridation ADN-ADN ;
- Séquençage de l'ADN ribosomique 16S ;
- Détermination du coefficient de Chargaff (G+C%).

Les actinobactéries sont classées dans le phylum des *Actinobacteria* la classe des *Actinobacteriaceae* qui comporte six ordres parmi lesquels figure l'ordre des *Actinomycetales* qui s'avère être le plus important (Bergey's Manual, 2012).

IV. Métabolisme général chez les actinobactéries

La diversité métabolique chez les *actinobactéries* est due à leur génome de grande taille qui renferme des facteurs de transcription contrôlant l'expression des gènes leur permettant de répondre à des besoins spécifiques (Singh *et al*, 2006). Selon Strub (2008), le métabolisme des actinobactéries peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.

1. Métabolisme primaire

Le métabolisme primaire chez les actinobactéries est semblable à celui des autres organismes et les métabolites produits forment la structure cellulaire et permettent le fonctionnement du métabolisme général (Theilleux, 1993). Ce sont des substances produites par le microorganisme en période de croissance active.

Pendant cette phase, des substances nécessaires à leur développement sont produites par des réactions enzymatiques, elles sont appelées métabolites primaires ou généraux tel que : les alcools, les enzymes, les acides organiques etc (Bill, 2007).

2. Métabolisme secondaire

La première définition du métabolisme secondaire date de 1891 et désignait les transformations aboutissant aux composés relativement peu importants de la physiologie végétale (Ginolhac, 2006). Se sont des substances synthétisées plus tardivement dans le cycle de vie. Ils sont, en général, produits au cours de la phase stationnaire (Horinouchi, 2002 ; Ginolhac, 2006).

Le métabolisme secondaire se différencie de celui primaire par le fait qu'il concerne des métabolites non directement impliqués dans la croissance et la vie de l'organisme (Theilleux, 1993 ; Challis et Hopwood, 2003 ; Ginolhac, 2006).

V. Co-culture et production de métabolites secondaires

La co-culture est la culture *in vitro* de deux ou plusieurs microorganismes (bactéries-bactéries, bactéries-champignons, champignons-champignons) sur le même milieu (Ezaki *et al*, 1992). Elle est également connue sous le nom de fermentation mixte ou consortium (Pettit, 2009). La co-culture se produit naturellement par l'interaction de différents microorganismes avec des organismes vivants tels que : des éponges, des algues et d'autres invertébrés (Zheng *et al*, 2000). Selon l'étude de Petit (2009), la co-culture augmente la bioactivité dans les extraits bruts. De plus, elle augmente le rendement en constituants bioactifs et l'activation de groupes de gènes silencieux responsables de la production de métabolite secondaire (Pettit, 2009).

La communication peut se faire par des interactions nécessitant un contact physique direct entre les microorganismes mais également à travers la production et la détection de molécules solubles ou volatiles diffusibles dans l'environnement (Justine, 2014).

1. Effet des interactions par contact cellulaire sur le métabolisme secondaire

Les interactions par contact peuvent influencer les voies de signalisation impliquées dans le métabolisme secondaire chez certains organismes par exemple : la production d'un décylprodigiosine, un antibiotique pigmenté, rouge, chez *Streptomyces lividans* TK23 est induite lors d'une co-culture avec *Tsukamurella pulmonis* TP-B0596, ou encore prodigiosine (Figure 2) Ces interactions peuvent aussi moduler la régulation épigénétique de certains clusters de gènes (Onaka *et al*, 2010).

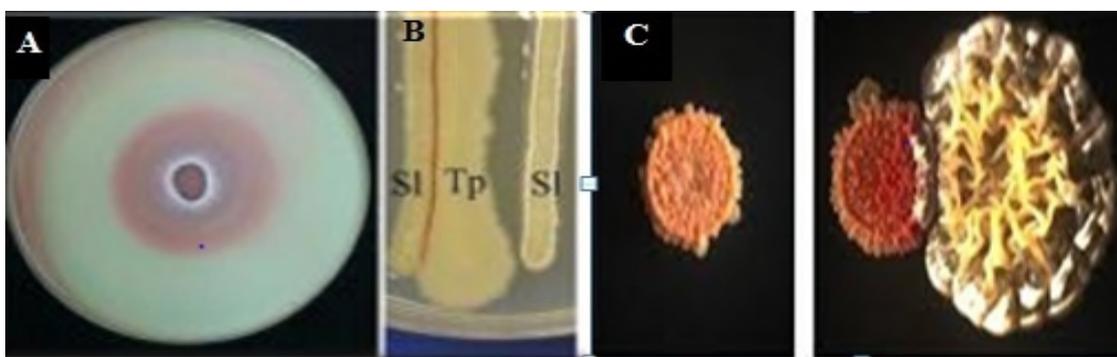


Figure 2 : Induction de la production d'un décylprodigiosine par *T. pulmonis* en co-culture avec *S. lividans* TK23. (A) co-culture entre *T. pulmonis* et *S. lividans* sur milieu Bennett. Les spores de *S. lividans* ont été étalées sur toute la surface du milieu gélosé et *T. pulmonis* a été inoculée au centre de la boîte. (B) *S. lividans* et *T. pulmonis* ont été inoculés en parallèle sur le milieu solide. Les souches Sl, *S. lividans*; Tp, *T. pulmonis*. La production de pigment rouge est observée uniquement au niveau du contact cellulaire (Onaka *et al*, 2010). (C) une colonie de *S. coelicolor* répond à un autre *Streptomyces*, *S. albus* en produisant des antibiotiques à la prodiginine rouge et des hyphes aériennes blanches épaisses (Traxler *et al*, 2013).

2. Effet des interactions chimiques sur le métabolisme secondaire

Tout comme les interactions par contact, les interactions chimiques peuvent stimuler la synthèse d'un métabolite secondaire en effet, selon Perez *et al*, (2011), La confrontation entre *S. coelicolor* et la protéobactérie *Myxococcus xanthus* déclenche la production de l'actinorhodine chez *S. coelicolor* ainsi que la formation du mycélium aérien. Ces phénotypes ne sont pas dépendants d'un contact cellulaire car une souche de *M. xanthus* non mobile mise en présence de *S. coelicolor* déclenche également le phénomène d'induction (Figure 3). *Myxococcus* produirait un facteur soluble, encore

inconnu, déclenchant la production d'actinorhodine. *M. xanthus* est capable de consommer d'autres microorganismes et même des vers. Les auteurs ont montré qu'après avoir détecté sa présence, *S. coelicolor* produirait alors l'actinorhodine en tant qu'agent répulsif. Cette réponse lui permettrait donc de se protéger contre d'éventuels agresseurs dans son environnement (Perez *et al*, 2011).

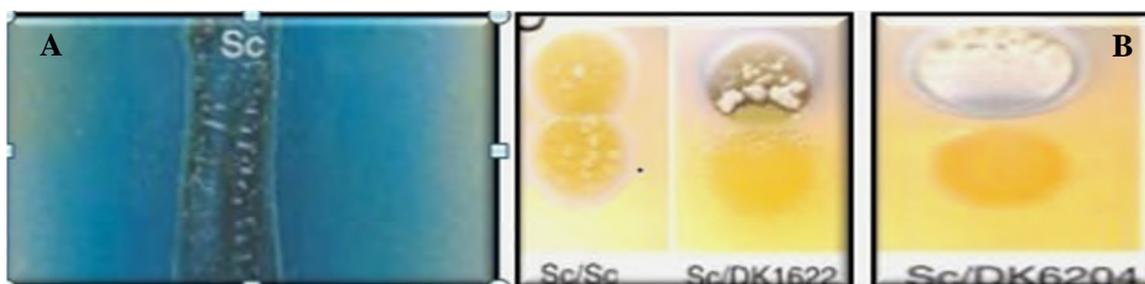


Figure 3: Stimulation de la production d'actinorhodine et du développement aérien de *S. coelicolor* en réponse à *M. xanthus*. (A) Réalisation d'une strie de *S. coelicolor* (Sc) sur milieu gélosé préalablement ensemencé avec un tapis de *M. xanthus*. La photo a été prise après 120h d'incubation. (B) Les cellules de *S. coelicolor* ont été mises en présence de deux souches de *M. xanthus*, la souche sauvage (DK1622) et un mutant non mobile (DK6204). Le témoin correspond à la confrontation entre *S. coelicolor* et *S. coelicolor*. Les photos ont été prises après 72h d'incubation. (Perez *et al*, 2011).

3. Quorum sensing et métabolisme secondaire

Les bactéries produisent un large répertoire de molécule signal. Ces molécules sont des composés organiques de faible poids moléculaire qui présentent une diversité fonctionnelle et chimique (Visick et Fuqua, 2005). Suite à des stimuli environnementaux et physiologiques, les molécules signal sont synthétisées et déclenchent alors des cascades de transduction de signaux ce qui permet de coordonner et de moduler l'expression de gènes cibles afin de mettre en place une réponse adaptée et rapide des bactéries à leur environnement (Atkinson et Williams, 2009). Ces systèmes de communication permettent ainsi de moduler les activités métaboliques des communautés microbiennes et leurs interactions (Yim *et al*, 2006). Ce procédé, nommé quorum sensing (QS), contrôle, à travers l'utilisation d'un large répertoire de molécules diffusibles, divers phénotypes chez les bactéries (Romero *et al*, 2011). Parmi les molécules les plus représentées, AHL (Acyl-Homosérines Lactones) chez les protéobactéries et les peptides signaux chez les bactéries à Gram positifs. La signalisation moléculaire apparaît donc importante voir même nécessaire à l'adaptation des bactéries à leur écosystème.

Dans le tableau I sont présentés quelques exemples de molécules actives produites par fermentation mixtes d'actinobactéries.

Tableau I : Quelques exemples de molécules bioactives produites par fermentation mixte d'actinobactéries.

Co-culture		
<i>Actinokineospora</i> sp et <i>Nocardioopsis</i> sp.	Phenazine	Dashti <i>et al</i> , (2014)
<i>Streptomyces lividans</i> et <i>Tsukamurella pulmonis</i>	Alchivemycine A	Onaka <i>et al</i> , (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i> et <i>Streptomyces rapamycinicus</i>	Fumicycline A Fumicycline B	König <i>et al</i> (2013) ; Marmann <i>et al</i> (2014)
<i>Emericella</i> sp et <i>Salinospora arenicola</i>	Emericellamides A et B	Oh <i>et al</i> , (2007)
<i>Streptomyces coelicolor</i> et <i>Myxococcus xanthus</i>	Actinorhodine	Perez <i>et al</i> , (2011)
<i>Aspergillus fumigatus</i> <i>MBC-F1-10</i> et <i>Streptomyces bullii</i>	Ergosterol, Brevianamide F, Spirotryprostatin A, 6-methoxyspirotryprostatin Fumitremorgin C, 12,13- Dihydroxyfumitremorgin C, Fumitremorgin B, Verruculogen, 11-O- methylpsurotin A, 11-O- methylpsurotin A2	Marmann <i>et al</i> , (2014) ; Rateb <i>et al</i> , (2013)

.

.

I. Matériel

1. Matériel analytique

Le matériel utilisé dans cette étude est résumé en annexe I.

2. Matériel biologique

2.1. Microorganismes étudiés « Actinobactéries »

Les souches d'actinobactéries notées S1, S3, S5, S6, S12 et A1 étudiées dans ce travail appartiennent à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LMA) de l'Université A. Mira de Bejaia. Elles ont été isolées par M^{elle} DJINNI en Février 2017 à partir d'algues marines de la région de Bejaia.

2.2. Germes cibles utilisés

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude sont présentés ci-dessous:

- **Bactéries à Gram positif**

-*Listeria innocua* **CLIP 74915**

- **Bactéries à Gram négatif**

-*Acinetobacter boumannii* **Rox** (résistante à l'oxacilline)

-*Salmonella Typhi* **ATCC 14028**

-*Vibrio cholerae* **ATCC 14035**.

- **Levure**

-*Candida albicans* **ATCC 10231**.

II. Méthodes

1.1. Etude macromorphologique des actinobactéries étudiés

Cette étude consiste à apprécier l'aspect des colonies, la couleur des mycéliums aériens (MA) et du substrat (MS), ainsi que les pigments solubles produits sur différents milieux de culture préconisés par l'International *Streptomyces* Project (ISP)(ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP6 et ISP9) (Shirling et Gottlieb, 1966) et sur les milieux Mincer eau de Mer (MEM) (50% et 100%) et Starch Casein Agar eau de mer (SCA) (50% et 100%) après incubation pendant 14 jours à 28°C. La composition de ces milieux est donnée en annexe II.

1.2. Etude micromorphologique

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique à un grossissement (x10) après 14 jours d'incubation à 28°C.

Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycéliums en place sans en altérer les structures.

Elle consiste à voir également la sporulation caractéristique des souches ainsi que la forme et la taille des spores.

2. Etude des caractères physiologiques

2.1. Production de pigments mélanoides

La production de pigments mélanoides par les 6 isolats étudiés est appréciée sur milieu gélosé ISP6.

2.2. Dégradation des sucres comme seule source de carbone

Les glucides ont été ajoutés au milieu ISP9 (milieu de base) à raison de 1 % (M/V). Les sucres utilisés sont : le tryptose, le saccharose, le glucose, le mannitol, le fructose, la mannose, l'arabinose, le rhamnose, le galactose, le xylose et la cellulose.

Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C pendant 14 jours et la croissance est estimée par l'appréciation du développement des mycéliums aériens et du substrat en comparaison au milieu contenant du glucose comme seule source de carbone (témoin positif).

2.3. Croissance à différentes températures

Ce test a pour but la mise en évidence de la capacité des actinobactéries à croître à différentes températures. Les souches sont ensemencées sur le milieu MEM50% eau de mer puis incubées à différentes températures (4, 28, 37, 40, 50 et 60°C) pendant 21 jours.

2.4. Résistance ou sensibilité à différentes concentrations de NaCl

Ce test est réalisé dans le but d'évaluer la résistance des 6 isolats à des concentrations croissantes en NaCl (0, 1, 3, 5, 7, 10 et 15%) sur Milieu Mincer pendant 21 jours d'incubation à 28°C.

2.5. Etude de la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds

Afin de mettre en évidence la résistance ou la sensibilité des souches d'actinobactéries étudiées aux métaux lourds, des milieux de culture gélosés ont été préparés en utilisant une gélose nutritive contenant différents métaux sous forme de sels organiques : le zinc ($ZnSO_4$), le fer ($Fe(NO_3)_3$), le chrome ($K_2Cr_2O_7$), le cuivre ($CuSO_4$), le cadmium ($Cd(NO_3)_2$) ainsi que le mélange de ces métaux, à raison de 50 mg/L (Daboor et al, 2014). La croissance des isolats est observée après 21 jours d'incubation à 28°C. L'appréciation de la résistance ou de la sensibilité des isolats testés est traduite par la croissance ou l'absence de cette dernière.

2.6. Croissance à différentes valeurs de pH

La croissance des 6 souches a été évaluée sur milieux Mincer 50% eau de mer à des valeurs de pH initiales de 5,7, 9 et 11. Les boîtes sont par la suite incubées à 28C° pendant 14 jours.

3. Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches d'actinobactéries étudiées, est réalisée aussi bien sur milieu solide par la méthode des cylindres d'agar (Bastide *et al*, 1986) que sur milieu liquide par la méthode des puits.

3.1. Méthode des cylindres d'agar (Bastide *et al*, 1986)

Le test d'antagonisme sur milieu solide consiste à ensemencer les 6 souches en stries serrées sur 4 milieux de culture de composition différente SCA (50% et 100%) et MEM (50% et 100%), puis incubées à 28C° pendant 7 jours. Des cylindres de 6mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un emporte-pièce puis déposés à la surface du milieu Mueller Hinton préalablement ensemencés par les germes cibles cités précédemment. Les boîtes sont mises à 4C° pendant 2 heures afin de permettre la diffusion des substances actives élaborées par les souches testées, puis incubées à 37C° pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et exprimées en millimètre.

Remarques

- Le mycélium aérien est mis en contact avec le germe cible.
- L'inoculum ne doit pas être utilisé au delà de 15 minutes après sa préparation.

3.2. Méthode des puits

Ce test consiste à mettre en évidence l'activité antagoniste des extraits bruts des 6 isolats ensemencés en stries serrées sur milieu MEM50% pendant 7 jours à 28 C°.

❖ Préparation des extraits bruts

Les 6 extraits bruts méthanoliques sont obtenus par macération des mycéliens et géloses, de chacune des 6 souches à l'aide d'un solvant organique : l'acétate d'éthyle, pendant une nuit sous agitation permanente.

Les extraits d'acétate d'éthyle ont fait objet, d'une évaporation a sec à l'aide d'un Rotavapor, afin d'éliminer totalement le solvant d'extraction.

Les extraits bruts sont par la suite récupérés dans un volume de 5ml de méthanol. Puis conservés à 4C° pour une utilisation ultérieure.

❖ Test d'antagonisme

A l'aide d'un emporte-pièce, des puits de 6mm de diamètre sont réalisés sur le milieu Mueller Hinton préalablementensemencé avec les germes cibles. Un volume de 100uL d'extraits bruts est déposé à l'intérieur de chaque puits. Les boîtes sont mises à 4C° pendant 2 heures puis incubées à 37C° pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et exprimés en millimètre.

4. Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats ensemencés en co-culture

La co-culture est la culture *in vitro* de deux ou plusieurs microorganismes sur un même milieu de culture. Ce test a pour but la stimulation des interactions entre les microorganismes afin d'augmenter le rendement des constituants bioactifs.

4.1. Préparation des suspensions de spores

Les suspensions de spores des 6 isolats sont préparées, en ensemencant les souches en stries serrées sur milieu MEM 50% puis mises à incubées à 28C° pendant 7 jours puis les spores sont récupérées dans 10 ml d'eau physiologique stérile. Les suspensions de spores ainsi préparées sont conservées à 4C° pour une utilisation ultérieure.

4.2. Etude phénotypique

Afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications phénotypiques des isolats en comparaison aux monocultures, une étude macromorphologique des souches est réalisée.

Elle consiste à apprécier l'aspect morphologique des colonies des 6 isolats après ensemencement en co-cultures et monoculture pendant 7 à 10 jours à 28C° sur milieu MEM 50% eau de mer. 15 combinaisons de souches sont réalisées (S1-S3, S1-S5, S1-S6, S1-S12, S1-A1, S3-S5, S3-S6, S3-S12, S3-A1, S5-S6, S5-S12, S5-A1, S6-S12, S6-A1 et A1-S12) selon le schéma illustré en figure4.

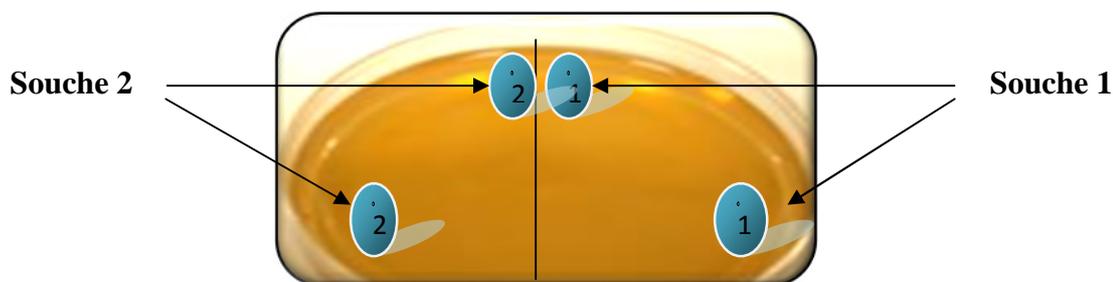


Figure 4 : Etude comparative de l'aspect morphologique des 6 souches d'actinobactéries ensemencées en monoculture et en co-culture sur milieu MEM 50%.

4.3. Mise en évidence de l'activité antagoniste des extraits bruts obtenus par co-culture

Les 15 combinaisons de souches citées en 4.2 sontensemencées en co-culture sur milieu MEM 50% et mises à incubées à 28C° pendant 7 jours.

Les extraits bruts sont obtenus pas macération en utilisant l'acétate d'éthyle comme solvant. Les extraits bruts sont obtenus après évaporation à sec, afin d'éliminer totalement le solvant d'extraction.

Les extraits bruts sont par la suite récupérés dans un volume de 5ml de méthanol puis conservés à 4C° pour une utilisation ultérieure.

❖ Test d'antagonisme

A l'aide d'un emporte-pièce, des puits de 6mm de diamètre sont réalisé sur le milieu Mueller Hinton préalablementensemencé avec les germes cibles .Un volume de 100uL d'extraits bruts est déposé à l'intérieur de chaque puit. Les boites sont mises à 4C° pendant 2 heures afin de permettre la diffusion des substances actives élaborées par les souches d'actinobactéries, puis incubées à 37C° pendant 24 heures. Les diamètres des zones d'inhibition sont alors mesurés à l'aide d'un pied à coulisse et exprimées en millimètre.

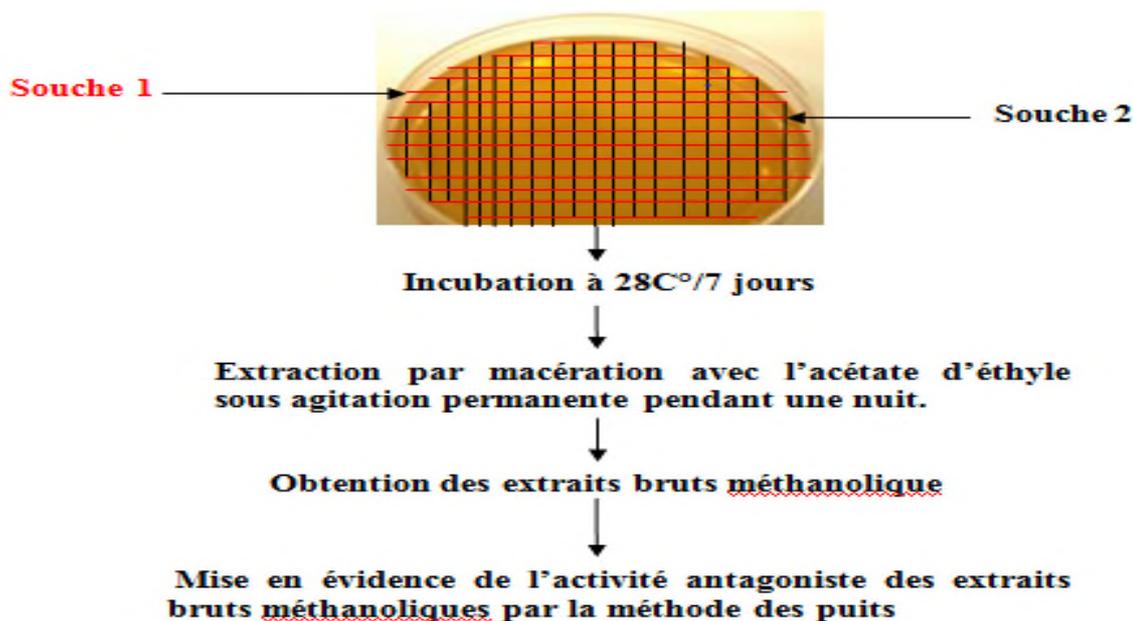


Figure 5 : Schéma de l'obtention des extraits bruts méthanolique après co-culture des actinobactéries et de la mise en évidence de l'activité antagoniste.

Dans ce chapitre, seront présentés les résultats et les discussions, des 4 parties de ce travail, relatives à l'étude des caractères morphologiques et physiologiques des 6 souches étudiées ainsi que la mise en évidence de leurs activités antagonistes vis-à-vis de germes pathogènes. Par ailleurs, l'étude phénotypique des combinaisons de souches cultivées en co-culture ainsi que l'étude de l'activité antagoniste de leurs extraits bruts ont également été abordées.

I. Etude morphologique des isolats

L'étude des caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques des 6 isolats est l'argument employé pour caractériser les genres d'actinobactéries sur différents milieux de culture.

➤ **Macromorphologique**

Les propriétés culturales des isolats étudiés S1, S3, S5, S6, S12 et A1 cultivées sur différents milieux ISP (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4 et ISP6) à 28°C sont notées après 7 jours d'incubation. D'après les résultats obtenus et présentés dans les tableaux II et III (Annexe III), il est clairement constaté que les souches S5, S6 et S12 présentent une bonne croissance et une sporulation abondante sur les milieux ISP1, ISP2 et ISP4 ainsi que sur les milieux SCA 50% et Mincer à 50% et 100% eau de mer.

En effet, les colonies sont de forme circulaire de petite taille et d'aspect rugueux. Toutefois, aucune croissance n'a été observée pour les souches S6, S5 et S12 sur les milieux ISP3 et ISP6.

Les mycéliums aériens présentent des colorations variées en fonction des milieux de culture considérés. En effet, il est blanc sur ISP1 et gris sur les milieux ISP2 et ISP4 pour les isolats S6 et S12. L'isolat S5 a présenté quant à lui une teinte grise claire sur ces 3 milieux de cultures. Par ailleurs, les mycéliums du substrat des 3 souches arboraient des couleurs variées selon le milieu utilisé : de jaune clair à marron pour S6 et S12 et rose foncée pour l'isolat S5

Les colonies des isolats A1, S1 et S3 sont de forme circulaire légèrement bombées présentant un aspect de craie sur les milieux ISP2, ISP4 et ISP6 où la croissance et la sporulation sont abondantes.

L'aspect morphologique sur quelques milieux de culture ISP est illustré dans la figure 6 ci-dessous.

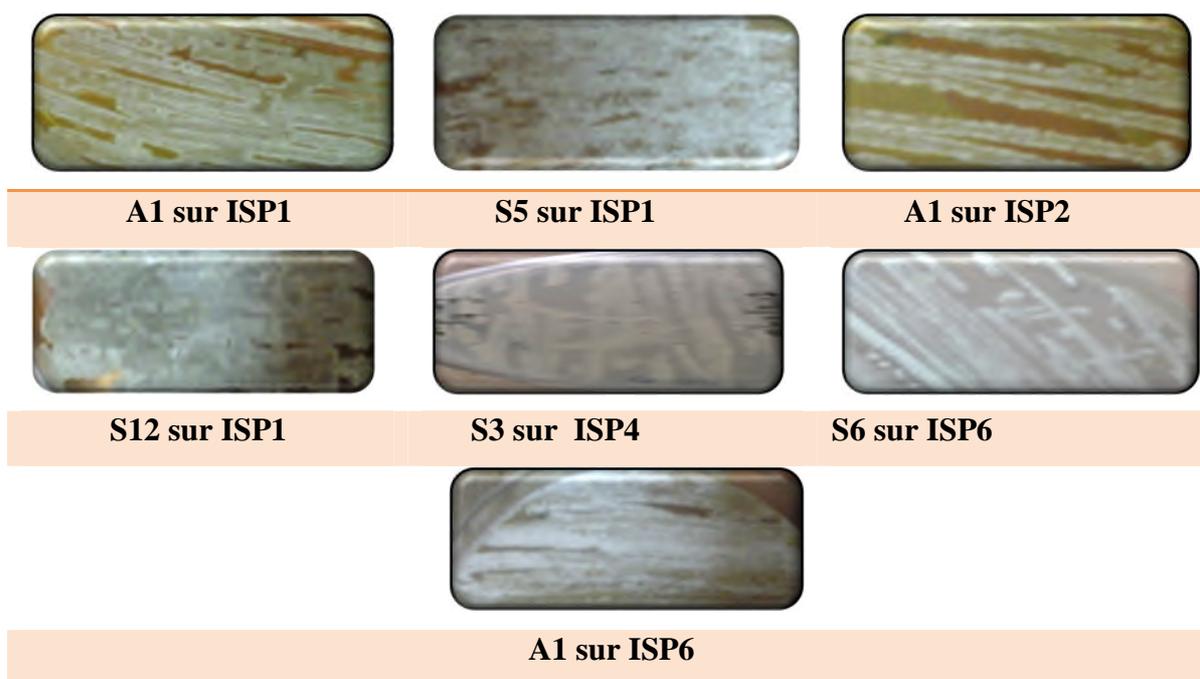


Figure 6 : Observation macromorphologique des isolats d'actinobactéries sur différents milieux ISP après 7 jours d'incubation à 28°C.

La couleur des mycéliums aériens est grise sur les milieux ISP1 pour l'isolat A1 et blanche sur le reste des milieux pour les 2 autres souches, par contre le mycélium du substrat arbore des couleurs variées selon la souche et le milieu considéré.

Sur les milieux SCA et Mincer 50% et 100% eau de mer des pigments diffusibles ont été observés notamment pour l'isolat S12 pour lequel un pigment de couleur rose clair est produit.

La plupart des 6 isolats développent des colonies après 48 heures d'incubation, c'est une caractéristique des actinobactéries à croissance rapide. En effet, Nodwel et Losick (1998) ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures d'incubation à 28°C.

Ces souches à croissance rapide peuvent être donc rapprochées au genre *Streptomyces*.

La description de l'ensemble des résultats de l'étude macromorphologique est rapportée dans les tableaux II et III (Annexe III)

➤ **Micromorphologie**

Les observations au microscope optique des mycéliums aériens des 6 isolats ont mis en évidence des hyphes fins, ramifiés, non séptés présentant des chaînes de spores immobiles de forme spiralés pour les souches S5 et A1, droites à légèrement spiralée (rectiflexibilis) pour S3, S6, S12 et S1 qui se fragmentent en spores sphériques.

Toutes les autres structures telles que les sporanges, les sporophores, les spores mobiles, les synnemata et les sclérotes sont absentes.

L'étude de ces critères directement réalisée sur boîte Pétri sous microscope optique à un grossissement (x10) après 14 jours d'incubation à 28°C est rapportée dans la figure 7 ci après.

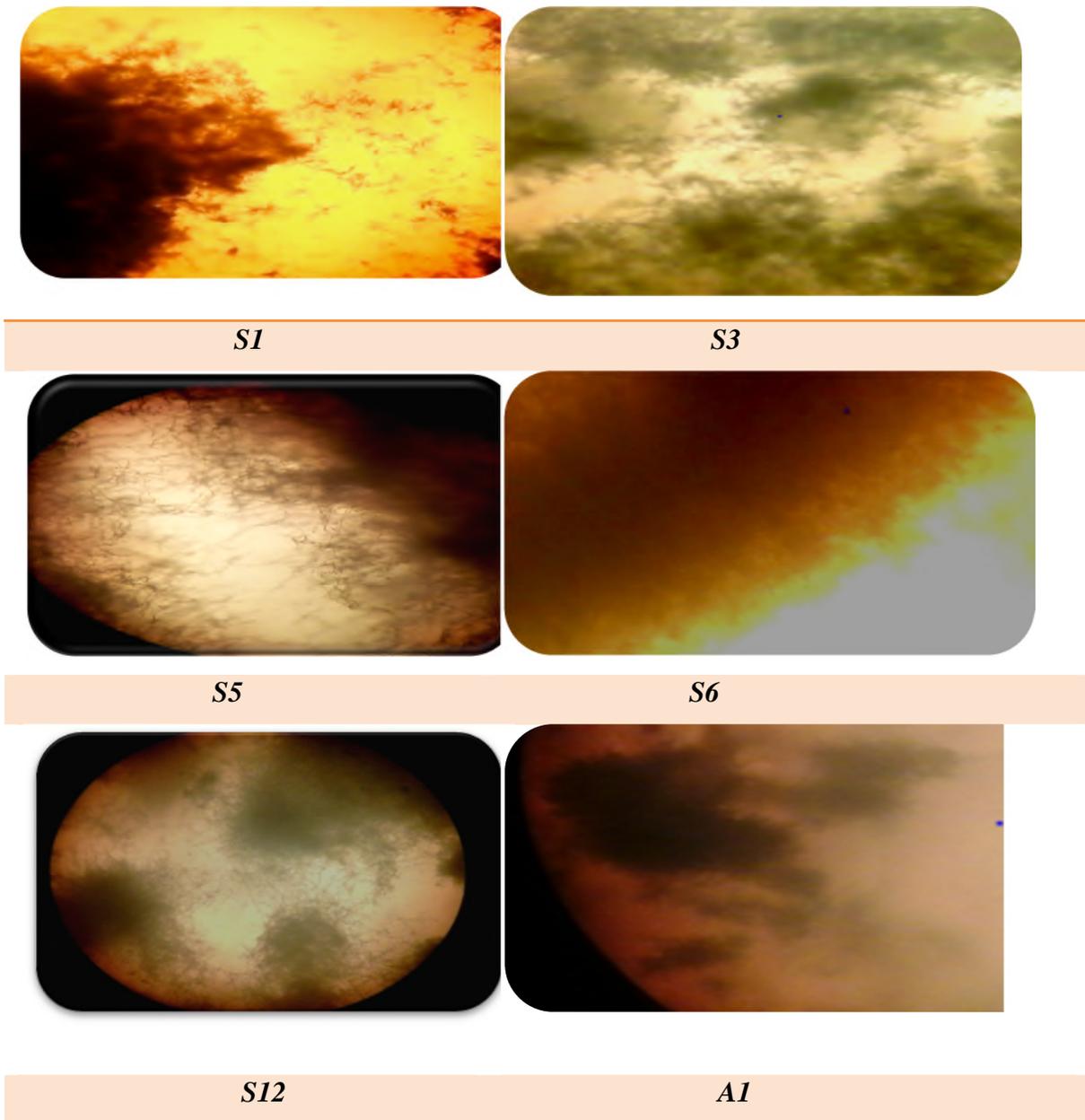


Figure 7 : Observations microscopiques des isolats d'actinobactéries après 14 jours d'incubation à 28C° au grossissement (x10).

Les isolats S3, S6 et S12 montrent des filaments ramifiés et cloisonnés portant des chaînes de spores droites à flexueuses.

Les isolats A1 et S5 montrent, plutôt, de longues chaînes de spores en crochets ou en boucles. Par ailleurs, l'isolat S1 montre des chaînes de spores ramifiées et cloisonnées.

A la lumière des critères macro et micromorphologiques, les isolats présentent des traits typiques liés au *Streptomyètes*, ce qui suppose leur appartenance au genre *Streptomyces* tel qu'il est rapporté dans le Bergey's Manuel de Bactériologie (Bergey's, 1989).

En effet, les bactéries appartenant à ce genre actinomycetale présente des caractéristiques typiques et facilement reconnaissables, particulièrement la forme des colonies ainsi que leurs aspect (présence de MA et du MS) mais également la disposition des chaines de spores et leur agencement. En effet Selon Shirling et Gottlieb (1976), l'identification des actinobacéries repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinobactéries (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiés avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (Williams et al, 1993).

II. Etude des caractères physiologiques

1. Dégradation des sucres comme seule source de carbone

D'après les résultats obtenus et illustrés dans le tableau IV ci dessous, il est clairement remarqué que les isolats S1, A1, S6 et S3 se développent sur pratiquement la majorité des sources de carbone testées à l'exception du tryptose pour S1 et S3.

Par ailleurs, le développement de mycélium du substrat uniquement, à été observé chez les souches S1 et S3 en présence de galactose. En revanche, la souche S5 est incapable d'assimiler le tryptose, le saccharose et le mannitol respectivement avec toutefois une croissance faible en présence de fructose et galactose pour S5 et rhamnose, galactose, arabinose, xylose et mannose pour l'isolat S12.

Tableau IV : Dégradation des sucres par les 6 isolats sur milieu ISP9 après 14 jours d'incubation.

Les sucres	souches					
	S1	S3	A1	S5	S6	S12
Tryptose	-	-	+++	-	+	++
Glucose	+	++	+++	+	+++	+++
Saccharose	+++	++	++	-	+++	+
Mannitol	+++	+	+++	+/-	++	-
Fructose	++	++	+++	+/-	+++	+

Mannose	+	++	+++	+/-	+++	+/-
Arabinose	++	++	+++	+++	+++	+/-
Rhamnose	+	+	+++	+	+++	+/-
Galactose	+/-	+/-	+++	+/-	+++	+/-
Cellulose	+++	+++	+++	+++	+	+
Xylose	++	+/-	+++	+	+/-	+/-

- : pas de croissance, +/- : développement du mycélium du substrat, + : croissance moyenne, ++ : bonne croissance, +++ : très bonne croissance

2. Croissance à différentes températures

D'après les résultats obtenus et illustrés dans le tableau V ci-après l'optimum de croissance des 6 isolats se situe entre 28 et 37C° après 14 jours d'incubation.

Par ailleurs, la croissance de toutes les souches est inhibée à 4C°, 50 et 60C°.

Tableau V : Croissance des 6 isolats d'actinobactéries à différentes température après 14 jours d'incubation.

Températures(C°)	souches					
	A1	S1	S3	S5	S6	S12
4	-	-	-	-	-	-
28	+++	+++	+++	+++	+++	+++
37	+++	++	+	++	+	+++
40	++	+	+/-	+	+/-	-
50	-	-	-	-	-	-
60	-	-	-	-	-	-

- : pas de croissance, +/- : croissance moyenne, + : bonne croissance, ++ : très bonne croissance.

3. Résistance ou sensibilité à différentes concentrations en NaCl

Ce test est réalisé afin d'étudier la capacité de chaque isolat à croître à différentes concentrations en NaCl. Selon les résultats obtenus et rapporté dans le tableau VI, nous remarquons que toutes les souches ont la capacité de croître en absence totale de NaCl alors qu'aucune croissance n'est observée à 15% de NaCl.

Les souches S3, S5 et S12 présentent une croissance optimale à 3%, alors qu'A1 tolère uniquement 1% de NaCl. Kuchner, (1987) cité par Tang et al, (2003) a classé les actinobactéries selon leur aptitude à croître en présence de NaCl. Sur la base de cette classification les souches S3, S5 et S12 pourraient appartenir aux actinobactéries modérément halophiles.

Tableau VI : Croissance à différentes concentration en NaCl

Les souches	NaCl (%)						
	0	1	3	5	7	10	15
A1	+++	+	+/-	+/-	+/-	+/-	-
S1	+++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-	-
S3	+	++	++	+/-	+/-	+/-	-
S5	+++	+	+	+/-	+/-	+/-	-
S6	+	-	-	-	-	-	-
S12	++	+++	++	+/-	+/-	-	-

- : pas de croissance, +/- : croissance du mycélium du substrat + : croissance moyenne, ++ : bonne croissance, +++ : très bonne croissance.

4. Etude de la résistance ou la sensibilité aux métaux lourds

D'après les résultats obtenus et présentés dans le tableau VII, dans le cas du cadmium, la totalité des souches testées présentent une sensibilité en présence de ce métal.

Il est clairement remarqué que l'isolat A1 développe une résistance en présence du fer, du chrome et de cuivre comme ions métallique. Par ailleurs, le développement du mycélium du substrat a été observé chez les isolats S1 et S12 en présence de fer, A1, S3 et S12 en présence de zinc, S1, S3, S5, S6 et S12 en présence de chrome et S1, S3, S6 et S12 en présence de cuivre.

De plus, la totalité des souches présentent une sensibilité sur le milieu de culture préparé à base de mélange de métaux lourds (cadmium, fer, zinc, chrome, cuivre).

Tableau VII : Résistance ou la sensibilité aux métaux lourds

Métaux lourds	A1	S1	S3	S5	S6	S12
NACd	-	-	-	-	-	-
NAFe	+++	+/-	+	+	+	+/-
NAM	-	-	-	-	-	-
NAZn	+/-	-	+/-	+	+	+/-
NACr	+++	+/-	+/-	+/-	+/-	+/-
NACu	+++	+/-	+/-	++	+/-	+/-

- : pas de croissance, +/- : croissance du mycélium du substrat + : croissance moyenne, ++ : bonne croissance, +++ : très bonne croissance.

5. Croissance à différentes valeurs de pH

Ce test consiste à déterminer l'effet de la valeur du pH sur la croissance des 6 isolats après 7 jours d'incubation à 28°C. Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau IX. L'ensemble de ces derniers obtenus, montrent clairement un développement variable des 6 souches sur les différents milieux préparés à différentes valeurs de pH.

En effet, l'ensemble des isolats a présenté un optimum de croissance à pH7. Toutefois, une très bonne croissance sur le milieu à pH5 a été enregistrée par l'isolat S3 qui cependant, présente une croissance moyenne à pH basique : 9 et 11.

De plus, les isolats S1 et S5 ont présenté une croissance plutôt bonne sur les milieux à valeur de pH 5 et 9, respectivement.

Tableau IX: Croissance des 6 souches à différentes valeurs de pH

pH	souches					
	<i>A1</i>	<i>S1</i>	<i>S3</i>	<i>S5</i>	<i>S6</i>	<i>S12</i>
5	+	++	+++	+	+	+/-
7	+++	+++	+++	+++	+++	+++
9	+	+	+	++	+	+
11	+	-	++	+/-	+/-	+

- : Absence de croissance, +/- : croissance du mycélium du substrat + : croissance moyenne, ++ : bonne croissance, +++ : très bonne croissance.

III. Mise en évidence de l'activité antagoniste des isolats d'actinobactéries

1. Méthode des cylindres d'agar

L'activité antimicrobienne des 6 souches étudiées a été mise en évidence par la technique de cylindres d'agar qui est une méthode de diffusion sur milieu gélosé.

La mesure des diamètres des zones d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C.

D'après les résultats obtenus, il est clairement constaté que les 6 souches étudiées présentent des activités antimicrobiennes relativement variables aussi bien vis-à-vis de la levure *Candida albicans* que des bactéries à Gram positif et à Gram négatif, en fonction des milieux considérés SCA (50 et 100%) et Mincer (50 et 100%) eau de mer. En effet, les diamètres des zones d'inhibition varient entre 0 et 19mm sur milieu MEM100% entre 0 et 12.5 mm sur milieu MEM 50% eau de mer.

Par ailleurs, les autres isolats n'ont présenté aucune activité sur les différents milieux étudiés. Le tableau X présentent les résultats du test d'activités d'antagoniste.

Tableau X : Activité antagoniste des 6 isolats à l'égard de 5 germes cibles.

Milieux	Germes cibles	Souches	<i>V.cholerae</i>	<i>S. Typhi</i>	<i>A.baumannii</i>	<i>L.innocua</i>	<i>C.albicans</i>
MEM50%		<i>S1</i>	0	0	0	0	12.5
		<i>S3</i>	0	0	0	0	0
		<i>S5</i>	0	0	0	0	0
		<i>S6</i>	0	0	0	0	0
		<i>S12</i>	0	0	0	0	0
		<i>A1</i>	8	0	0	0	7
MEM100%		<i>S1</i>	0	0	0	0	19
		<i>S3</i>	0	0	0	8	0
		<i>S5</i>	8	9	0	0	8
		<i>S6</i>	0	0	0	0	0
		<i>S12</i>	0	0	0	0	0
		<i>A1</i>	0	7	0	6.5	9

2. Méthode des puits

Une deuxième méthode d'évaluation de l'activité antimicrobienne a été réalisée qui est la méthode des puits des cultures d'actinobactéries sur milieux MEM 50% eau de mer. La mesure des diamètres des zones d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation à 37°C et les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 8 et la photo 9.

Les résultats montrent clairement que les diamètres des zones d'inhibition des extraits bruts méthanoliques diffèrent d'un germe cible à un autre et d'un extrait à un autre. En effet, les 6 extraits bruts présentent un bon antagonisme vis-à-vis des bactéries à Gram négatif (*V.cholerae* et *S.Typhi*) et la bactérie à Gram positif (*L. innocua*) et la levure *C. albicans*.

L'extrait de l'isolat S5 est doté une activité exclusivement antibactérienne. En effet, des zones d'inhibition de 27, 21, 19.5, 18.5, 18, 14 et de 10mm ont été enregistrées à l'encontre de *L. innocua*, *V. cholerae*, *S.Typhi* et *A. baumaannii*.

Le même résultat a été constaté pour les extraits bruts des isolats S12, A1 et S1 qui ont présenté également une activité antibactérienne.

Contrairement à l'extrait brut de l'isolat S6 qui a présenté une activité antifongique pour la levure *C.albicans* avec un diamètre d'inhibition de 16.5mm.

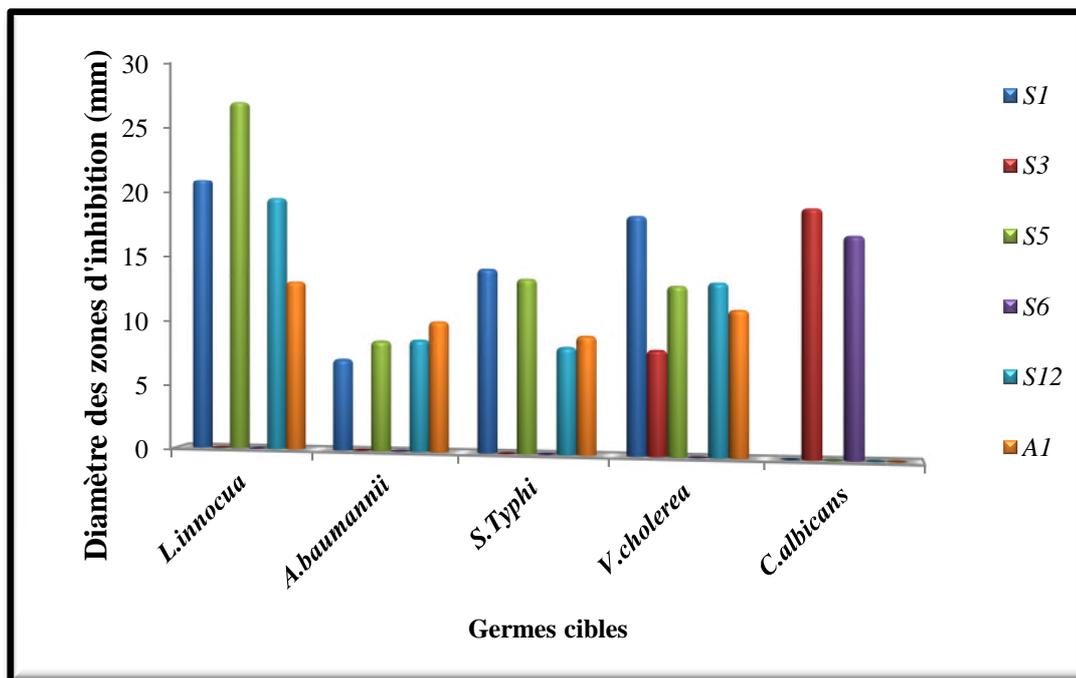
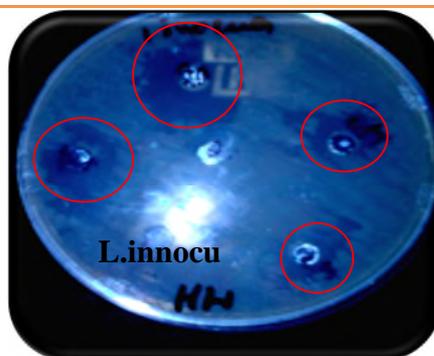


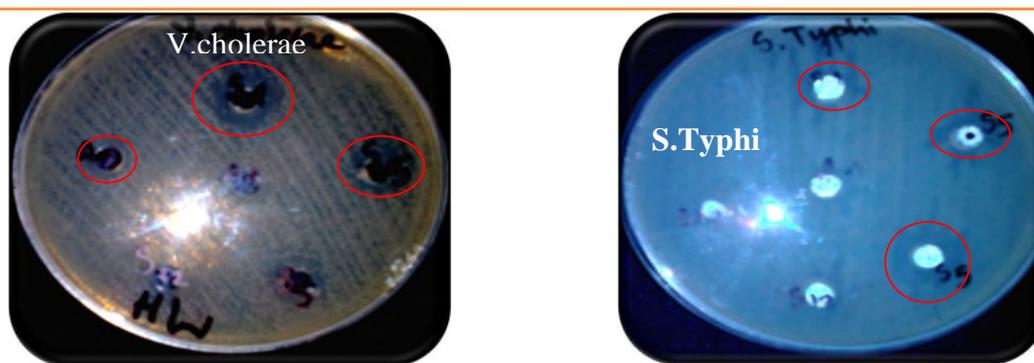
Figure 8 : Activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques des 6 isolats à l'égard de 5 germes cibles.

La variation de l'activité antimicrobienne des extraits bruts peut être expliquée par la variation de la composition chimique des molécules produites par les actinobactéries (Boudjouref, 2011).

En effet, Boughachiche et al, (2005) et Boudemagh et al, (2005) expliquèrent cette différence au niveau des zones d'inhibition par le fait qu'une souche d'actinobactérie peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectre d'action).



A1, S1, S3 et S5



A1, S1 et S3

S1, S5 et S3

Figure 9 : Photographie des résultats de l'activité antagoniste des extraits bruts réalisés par la méthode des puits des 6 isolats vis-à-vis germes cibles.

IV. Etude phénotypique des isolats cultivés en co-culture

Afin de mettre en évidence d'éventuelles modifications phénotypiques des 6 isolats cultivés en co-culture en comparaison aux monocultures, une étude morphologique est effectuée. Pour ce fait, 15 combinaisons de culture ont été réalisées et effectuées et ces expériences avaient pour but de révéler certains comportements de stimulation de croissance ou tous phénotypes visibles d'un organisme sur l'autre.

D'après les résultats rapportés dans le tableau IX il est clairement remarqué que les combinaisons de souches étudiées présentent des modifications phénotypiques en comparaison avec monoculture (tableau II, annexe III) selon la couleur des mycéliums aériens, l'aspect des colonies et la production des pigments diffusibles telles que les combinaisons S1-S3 et S3-S12.

En effet, la combinaison S1-S3 présente une même couleur du mycélium aérien, elle est de crème en co-culture, de gris clair pour S1 et de beige pour S3 en monoculture.

Par ailleurs, des colonies moyennes rugueuses en co-culture et sphérique, bombé en monoculture avec production des pigments marron clair en cette dernière.

Toutefois, la combinaison S3-S12 a présenté une modification de la couleur du mycélium aérien entre mono et co-culture. En effet, la souche S1 qui présentait un mycélium aérien de couleur crème en monoculture arborait un mycélium aérien une fois cultivée en présence de la souche S3. Il en eu de même pour l'isolat S3 dont le mycélium aérien est passé de crème au beige. Concernant l'aspect des colonies, elles sont de tailles moyenne et rugueuses en co-culture et sphériques et bombées en monoculture avec production du pigment marron clair. Le même constat est effectué pour la combinaison S3-S12 ou une significative de l'aspect phénotypique entre mono et co-culture a été observé.

D'après les résultats obtenus, des différences phénotiques entre mono et co-culture sont constatées. Ces modifications peuvent être probablement dues à la production de nombreux métabolites secondaires (ou leur produits de dégradation) pigmentés autres que ceux produits en monoculture.

Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Justin, (2014) qui a expliqué l'apparition ou la disparition d'une couleur lors des co-cultures par un effet d'interaction sur la synthèse d'un ou de plusieurs métabolites secondaires.

Tableau XI : Etudes des caractères morphologiques des isolats ensemencés en co-culture sur milieu MEM 50%.

<i>Combinaisons</i>	Croissance	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium du substrat	Aspect des colonies	Production des pigments diffusibles
<i>S1-S3</i>	++	Crème-Crème	Beige-Beige	Moyennes, rugueuses	-
<i>S1-S5</i>	++	Beige- Beige	Jaune-Jaune	Moyennes, rugueuses, bombés	-
<i>S1-S6</i>	++	Jaune- Jaune	Jaune-Jaune	Petites, rugueuses, aplaties	-
<i>S1-S12</i>	++	Gris-Blanc	Marron foncé- Marron foncé	Petites, rugueuses	+ Marron foncé
<i>S3-S12</i>	++	Jaune clair- Jaune clair	Beige-Beige	Petites, rugueuses	-
<i>S3-A1</i>	++	Blanc- Blanc	Jaune clair- Jaune clair	Petites, rugueuses	-
<i>S5-A1</i>	++	Blanc- Jaune clair	Beige-Beige	Petites, rugueuses	-
<i>S6-S12</i>	++	Beige - Beige	Beige-Beige	Petites, rugueuses	-
<i>S6-A1</i>	++	Blanc-Blanc	Beige - Beige	Petites, rugueuses	-
<i>S12A1</i>	++	Crème- Blanc	Marron foncé- Marron foncé	Petites, rugueuses	+ Marron foncé

+ : production des pigments diffusible. ++ : Bonne croissance.- : Absence de production des pigments diffusibles.

IV.1 Activité antagoniste des extraits bruts obtenus par co-culture

Dans le but d'étudier la capacité des 15 extraits bruts à inhiber la croissance des germes cibles, un test d'antagonisme basé sur la méthode des puits a été réalisé. Les résultats obtenus sont illustrés dans les figures 10 et 11.

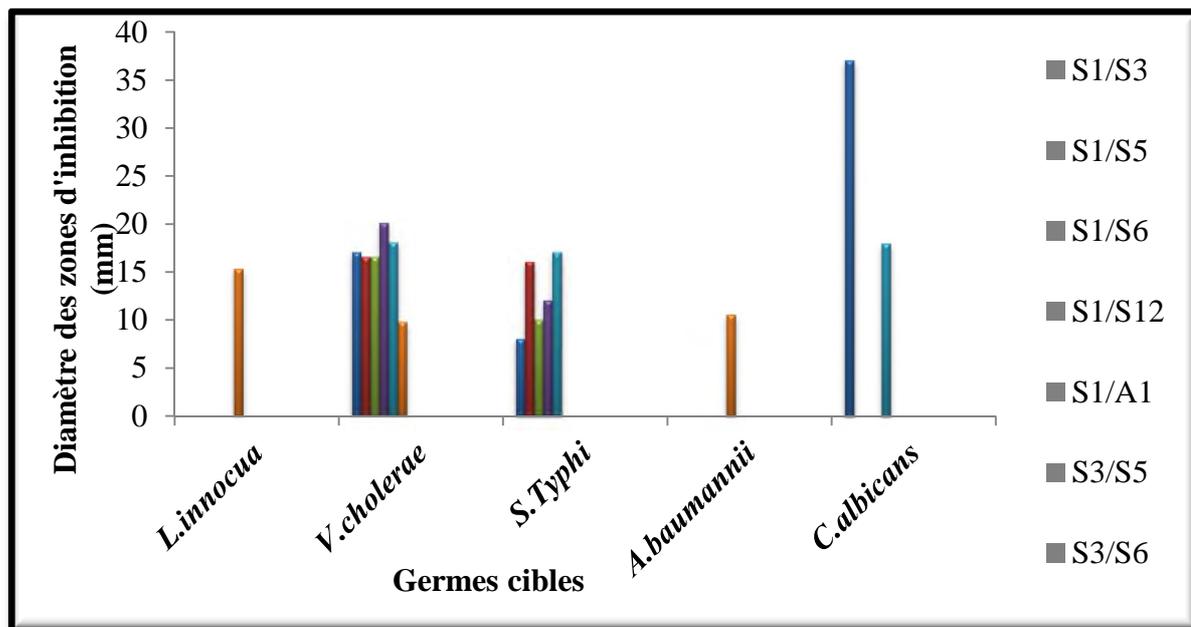


Figure 10: Activité antagoniste des extraits bruts des co-cultures méthanoliques à l’égard de 5 germes cibles.

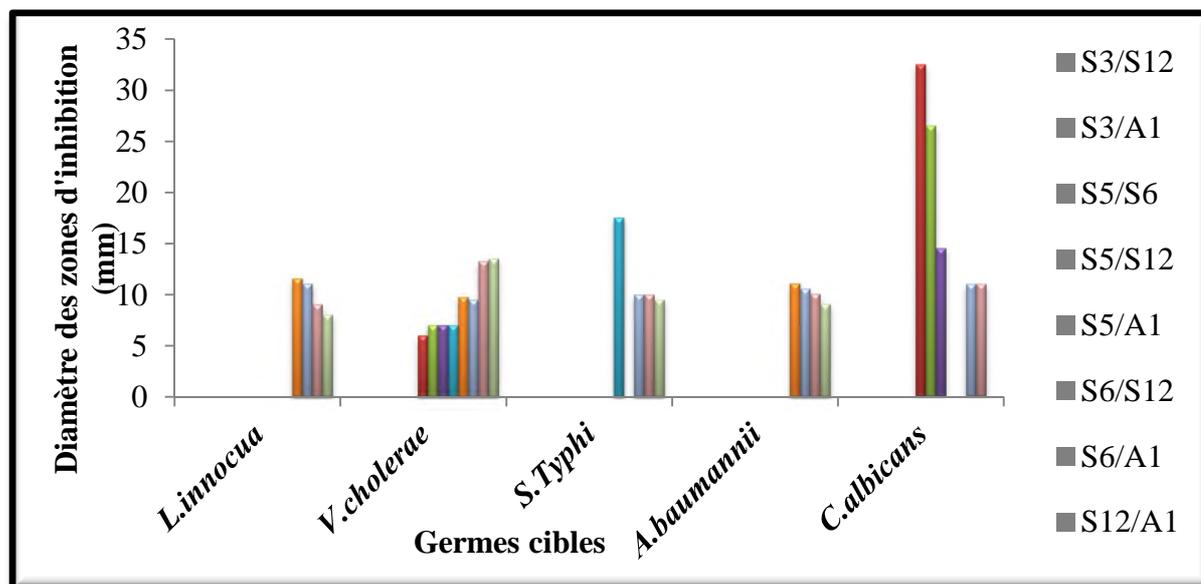


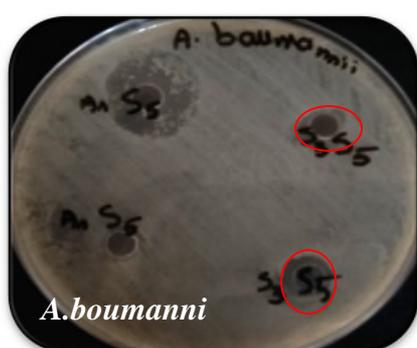
Figure 11: Activité antagoniste des extraits bruts des co-cultures méthanoliques à l’égard de 5 germes cibles.

Les résultats obtenus montrent que les diamètres des zones d’inhibition diffèrent d’un germe cible à un autre et d’un extrait à un autre. En effet, les 15 extraits bruts ont présenté un effet inhibiteur important vis-à-vis des 5 germes cibles testés en comparaison avec les résultats obtenus en monoculture notant des diamètres d’inhibition atteignant 37mm obtenus à l’encontre de *C.albicans* avec l’extrait S1-S3 suivi de l’extrait S3-S12

avec un effet inhibiteur de 32.5mm de diamètres. Par ailleurs, des activités inhibitrices remarquables ont été obtenues pour les extraits S3-A1, S16 et S5- S6 vis-à-vis du pathogène *C.albicans* avec des diamètres atteignant 37,18 et 14.5mm respectivement. Des effets antagonistes à l'encontre de *V.cholerae* ont également été enregistrés pour pratiquement tous les extraits bruts testés dont les diamètres d'inhibition entre 18mm et 6.5mm.

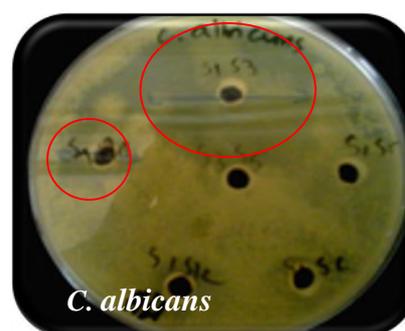
Des résultats suivants sont également obtenus à l'égard de *S.Typhi* et *L.innca* en comparaison à l'antagonisme des extraits bruts obtenus en monoculture.

Toutefois, ces résultats montrent clairement une augmentation de l'effet antagoniste des extraits bruts obtenus par co-culture, qui peut être expliqué très probablement par soit, une amélioration du rendement de production d'une ou de plusieurs molécules actives et ou par la synthèse et la production de nouvelles molécules actives suite à la stimulation de leur métabolisme secondaires.



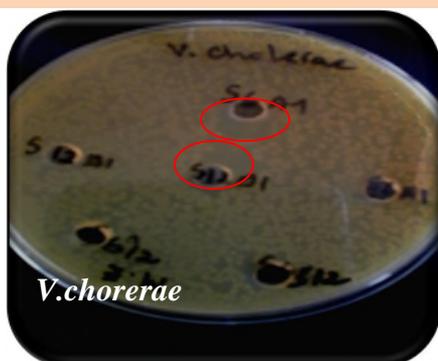
A.baumannii

A1- S5 et S3-S5



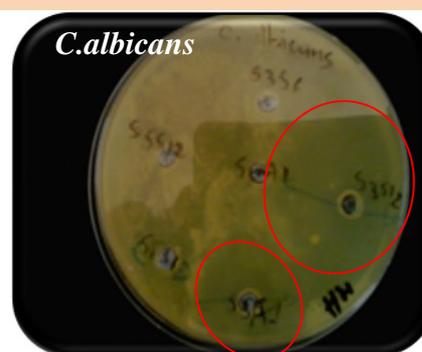
C. albicans

S1-S3 et S1-A1



V.cholerae

S6-A1 et S12-SA1



C.albicans

S3-A1 et S3-S12

Figure 12 : Photographie des résultats d'activité antagoniste des combinaisons vis-à-vis germes cibles.

Les extraits bruts obtenus par co-culture n'ont présenté aucune activité antagoniste par rapport aux extraits bruts obtenus par monoculture. En effet, les extraits S1-S3, S1-S5, S1-S6, S1-S12, S1-A1, S3-S12, S3-A1, S5-S6 et S5-S12 n'ont manifesté aucune activité à l'encontre des 5 germes cibles testés, manifestant ainsi la perte de l'effet antagoniste enregistré en monoculture.

Ce phénomène peut être expliqué probablement, par la répression des voies de synthèse de molécules actives produites lors des monocultures d'une part, d'autre par, l'interaction des souches entre elle a pu favoriser la production d'autres molécules ne présentant pas d'activité antibiotique.

Dans cette présente étude, nous nous sommes proposé d'étudier les aspects morphologiques, physiologiques et la mise en évidence de l'activité antimicrobienne de souches d'actinomycètes d'origine marine cultivées en mono et co-culture.

Pour atteindre cet objectif, le travail a été divisé comme suit

Des études d'identification morphologique, physiologique ont été réalisées et les résultats obtenus ont permis de rattacher les souches étudiées au genre *Streptomyces*. Cependant, une étude chimiotaxonomique reste indispensable.

D'autre part, l'étude physiologique a permis de déterminer leur capacité à se développer en présence de différentes sources de carbone, de métaux lourds, notamment pour l'isolat A1, ainsi qu'en présence de différentes concentrations en NaCl, de valeurs de pH et de températures.

Des tests d'antagonisme sont réalisés en cultivant les souches étudiées sur quatre milieux de culture de composition différentes ont démontré un effet inhibiteur faible, et cela sur tout les milieux utilisés.

La production et l'extraction des molécules bioactives a permis l'obtention d'extraits méthanoliques nécessaire à l'évaluation de l'activité antagoniste par la méthode des puits à l'égard de 5 souches microbienne (*A.baumannii*, *L.innocua*, *S.Typhi*, *V.cholerae* et *C.albicans*). Les résultats indiquent que tous les extraits bruts testés possèdent une activité antimicrobienne vis-à-vis des germes cibles testés.

La co-culture est l'une des méthodes utilisées pour stimuler les interactions entre les microorganismes afin d'améliorer le rendement de la production des molécules bioactives.

L'analyse des interactions potentielles des 6 souches d'actinobactéries testées a été réalisée et ces expériences avaient pour but de révéler certains comportements de stimulation de croissance et de production ou tous phénotypes visible d'un organisme sur l'autre.

L'étude phénotypique de différentes combinaisons de souches a révélé la présence d'interactions favorisant l'apparition ou la disparition de certains critères notamment, la couleur des mycéliums aériens et des substrats ainsi que la production de pigments diffusibles.

L'activité antagoniste évaluée à l'égard de 5 souches cibles a révélé une amélioration de l'activité antimicrobienne pour certains extraits bruts obtenus par co-culture d'une part et une disparition de l'effet antagoniste chez d'autres extraits bruts en comparaison aux activités obtenus en monocultures.

Ces résultats peuvent s'expliquer par des phénomènes de stimulation ou de répression et d'inhibition du métabolisme secondaire des souches d'actinobactéries.

Toutefois, il ressort de l'intérêt de poursuivre les investigations autour des axes suivants

Etude des profils métaboliques de tous les extraits bruts obtenus en mono et co-culture afin de vérifier la production éventuelle de nouvelles molécules ;

Etude d'autres interactions entre actinobactéries –champignons et actinobactéries-bactéries pathogènes, et enfin ;

Etude d'une éventuelle combinaison entre plusieurs souches d'actinobactéries.

A

Abbas I.H. A biological and biochemical studies of Actinomycetes isolated from Kuwait saline soil-Kuwait, *J. Appl. Sci. Res*, (2006); 2(10), p.809-815.

Andriambololona T. Etude biologiques et chimiques des métabolites secondaires des actinomycètes telluriques cas de la forêt d'Ankafobe, (2010) ; pp5-10.

Atkinson S, Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *J R Soc Interface*, (2009) ; 6, p. 959–978.

B

Badji B. Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, (2006); p 226.

Bastide. A ; de Méo ; M ; Andriantsoa. M; Laget. M; Duménil. G. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen. J*, (1986); 2, p. 453-466.

Bill .I.La biologie de A à Z. Edition. Dunod, Paris, (2007), p. 344P.

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg 10* isolated from a Saharan soil. *Microbiol. Res.*, (2007); 161, p. 288-298.

Boudjouref. M. (2011). Etude de l'activité antioxydante et antimicrobienne d'extraits d'*Artemisia campestris* L. Thèse de Magister. Université Ferhat Abbes, Sétif.

Boughachiche F, Reghioua S, Oulmi I, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A et Boulahrouf A. Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkha d'Ain Mlila. *Science and Technology of Advance Materials*, (2005) ; 23, p. 5-10.

e

Choulet F. Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extré Hodgson D. A. (2006). Differentiation in actinomycetes. In: *Prokaryotic Structure and Function*, Cambridge University Press, Cambridge. mités chromosomiques. Thèse de Doctorat. Université Henri Poincaré, Nancy1, p. 210.

Cross T et Goodfellow M. (1973). Taxonomy and classification of the actinomycetes. Actinomycetales: characteristics and practical importance. Sykes G and Skinner F.A(Eds) Academic press. London and New-York, p. 11-112.

D

Daboor S.M., Amany M.H., Neven Abd Elfatah E., and Hanouna S.I. Heavy metal adsorption of *Streptomyces chromofuscus*. J. C. L. Med, (2014); 2(6),p. 431-437.

Demain. A.L; and Lancini. G. Bacterial Pharmaceutical Products in Prokaryotes, (2006); 1,p. 812–833.

Dashti, Y.; Grkovic, T.; Abdelmohsen, U. R.; Hentschel, U.; Quinn, R. J. Production of induced secondary metabolites by a co-culture of sponge-associated actinomycetes, *Actinokineospora* sp. EG49 and *Nocardiosis* sp. RV163. Mar. Drugs. (2014); 12,p. 3046-305.

E

Ensign J. C.; Normand p.; Burden J. P.; Yallop C. A. Physiology of some actinomycetes genera. Rev. Microbiol, (1993); 144, p. 657-660.

Ezaki, M, Iwami, M, Yamashita, M, Komori, T, Umehara, K & Imanaka, H. 'Biphenomycin A production by a mixed culture', Applied and Environmental Microbiology, (1992); 58(12), p. 3879-82.

G

Ginolhac A. (2006). Metagenomique et bioinformatique. Etude des polyketides synthases bactériennes. Thèse de doctorat. Université Claude Bernard, Lyon I. p 146.

Goodfellow M; Kampfer P; Busse HJ; Trujillo M.E; Suruki K; Ludwig W; Whitman W.B. (2012). Taxonomic outline of the phylum Actinobacteria. In: Whitman WB Editor. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^{ème} edition. New York: Springer 1-2024.

Goodfellow M.; Williams S. T. Ecology of actinomycetes. Annuals Review of Microbiology, (1983); 37, p. 189-216.

Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M. Introduction to and importance of the

actinomycetes. *In*: « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M., Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, (1984), p. 1-6.

#

Holzapfel W., Brost I., Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P. S., Teniola D., Addo P. Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone . *PCT Int. Appl*, (2002), p. 19.

Hopwood D. A. Streptomyces genes: from Waksman to Sanger. *J .Ind Microbiol Biotechnol*, (2003); 30(8), p. 468–471.

Horinouchi S. A microbial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *streptomyces griseus*. *Frontiers in Bioscience*, (2002); 7, p. 2045-2057.

?

Jakimowicz D. Chromosome segregation and cell division during the growth and differentiation of Streptomyces. *Postepy Hig. Med. Dosw*, (2007); 61, p. 565-575.

Justin G. (2014). Etude de l'interaction entre Streptomyces et pseudomonas. Thèse de doctora. En Ecolotoxicologie, Biodeversité, Ecosysteme. Univzrcité lorraine. Faculté des sciences et Technologie, p48.

κ

Kim S.B., Seong C.N., Jeon S.J., Bae K.S., et Goodfellow M. Taxonomic study of neurotolerant acidophilic actinomycetes isolated from soil and description of *Streptomyces yeochonensis* sp.nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*, (2004); 54, p. 211-214.

Kim T. K., Hewavitharana A.K., Shaw P.N. et Fuerest J.A. Discovery of a new source of rifamycin antibiotics in marine sponge actinobacteria by phylogenetic prediction. *App l Environ microbial*, (2006); 72, p. 2118-2125.

König, C.C.; Scherlach, K.; Schroeckh, V.; Horn, F.; Nietzsche, S.; Brakhage, A.A.; Hertweck, C. Bacterium induces cryptic meroterpenoid pathway in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *ChemBioChem*, (2013); 14, 938–942.

Kumar Ashok, Bisht B.S., Joshi V.D. Biosorption of Heavy Metals by Four Acclimated Microbial species, *Bacillus spp*, *Pseudomonas spp*, *Staphylococcus spp* and *Aspergillus niger*, Journal of Biological and Environmental Science Turkey, (2010); 4(12), p .97108.

Kuster E. and Williams. S.T. Selection of media for isolation of *Streptomyces*. Nature. (1964); 202, p .928-929.

L

Larpent JP, Sanglier JJ. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Paris: Ed. Masson. p. 481.

Lechevalier. M.P ; Lechevalier. H.A. (1970a). Lechevalier. H.A. (1970b) Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic. Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. The Actinomycetales. Prauser. H; Fisher Verlag. G; Jena, p. 311-316.

Lechevalier. M.P; actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol., 20, 435-443.

Lechevalier M.P. - Ecological association involving actinomycetes. *Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.).Zbl. Bakt. Suppl, (1981); 11, p. 159-166.

M

Marmann, A., Aly, A.H., Lin, W., Wang, B., Proksch, P. Co-cultivation—a powerful emerging tool for enhancing the chemical diversity of microorganisms. Mar. Drugs, (2014); 12,p. 1043–1065.

Mincer. T.J; Jensen. P.R; Kauffman. C.A, and Fenical. W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. Applied and Environmental Microbiology, 68 (10), p. 5005–5011.

N

Newman, DJ & Cragg, GM. (2016). 'Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014', J. Natural Products.

Nodwell, J.R., Losick, R. Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, (1998); 180(5), p. 1334–1337.

O

Oh, D.-C.; Kauffman, C. A.; Jensen, P. R.; Fenical, W. Induced production of emericellamides A and B from the marine-derived fungus *Emericella* sp. In competing co-culture. *J. Nat. Prod.*, (2007); 70, p.515-520.

Omura S. (1992). Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J. ind. Microbiol.*, 1 Onaka, H.; Mori, Y.; Igarashi, Y.; Furumai, T. Mycolic acid-containing bacteria induce naturalproduct biosynthesis in *Streptomyces* species. *Appl. Environ. Microbiol.*, (2011); 77, p.400-406.

Onaka H, Mori Y, Igarashi Y, Furumai T. Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in *Streptomyces* Species. *Appl Environ Microbiol*, (2010); 77, p. 400–406

Oskay M., Tamer A. and Azeri C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol*, (2004); 3(9), p.441–446.

P

Panjwani R, Deshpande A, Mahajani S et Joshi K. Production of bioactive compounds using marine isolates in co-culturing systems, (2015), vol. 2, p. 2393-8374.

Parungao M.M., Maceda E.B.G et Villano M.A.F. Screening of Actinomycetes from marine. Producing Actinomycetes from marine, Brackish and Terrsttial sediments of Samal Island, Philippines. *Journal of research in science, Computing and Engineering*, (2007); 4, 3, p. 29-38

Peraud.O. (2006). Isolation and characterization of a Sponge. Associated actinomycete that produces manzamines. Dissertation submitted to the Faculty of the Grauate School of the University of Maryland.

Perez, J, Munoz-Dorado, J, Brana, A.F, Shimkets, L.J., Sevillano, L., Santamaria, R.I. Myxococcus xanthus induces actinorhodin overproduction and aerial mycelium formation by *Streptomyces coelicolor*. *Microb. Biotechnol*, (2011); 4, p. 175–183.

Pettit, R. K. Mixed fermentation for natural product drug discovery. *Appl. Microbiol. Biot.* (2009); 83, p. 19-25.

Pizzul. L. (2006). Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes.

Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). p 39.

R

Rateb, M.E., Hallyburton, I., Houssen, W.E., Bull, A.T., Goodfellow, M., Santhanam, R., et al. Induction of diverse secondary metabolites in *Aspergillus fumigatus* by microbial co-culture. *RSC Adv*, (2013); 3, p. 14444–14450.

S

Sabaou N. (1988). Contribution à l'étude des sols des palmerais algérienne .Systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Science Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger, pp. 65-68.

Shirling. E.B; and Gottlieb. D. Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Sys Bacteriology*, (1966); 16 (3), p. 313-340.

Shirling, E. B., Gottlieb D. (1976). Retrospective evaluation of International *Streptomyces* Project taxonomy criteria. *Actinomycetes the boundary microorganisms*. Edition. Arai T. Tokyo, p. 9–42.

Singh S.L.; Baruah I.; Bora T.C. Actinomycetes of lake Loktat Habitat: Isolation and screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology*, (2006); 5 (2), p. 217-221.

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Université de Toulouse, (France), pp.251.

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

T

Tang. S. K; Li. W. J; Dong. W; Zhang. Y. G; Xu. L; and Jiang. C. L. Studies of the biological characteristics of some halophilic and halotolerant Actinomycetes isolated from saline and alkaline soils. *Actinomycetologica*, (2003); 17 (1), p. 06–10.

Traxler, MF, Watrous, JD, Alexandrov, T, Dorrestein, PC & Kolter, R. 'Interspecies Interactions Stimulate Diversification of the *Streptomyces coelicolor* Secreted Metabolome',

mBio, (2013a); vol. 4, n^o 4.

V

Visick KL, Fuqua C. Decoding Microbial Chatter: Cell-Cell Communication in Bacteria. *J Bacteriol*, (2005); 187, p .5507–5519.

W

Weyland H. Actinomycètes of the bottom sediments of various seas. GERBAM-Deuxième Colloque International de bactériologie marine. CNRS, n Brest, 1-5 octobre 1984 IFREMER , actes de Colloques, (1986);3,p. 73 -79.

WHO. (2008). The Global Burden of Disease. 2004 Update, World Health Organization, Geneva.

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. Detection and identification of novel actinomycetes. *Res Microbiol*, (1993); 144(8), p. 653–656.

Y

Yim G, Huimi Wang H, Davies J. The truth about antibiotics. *Int J Med Microbiol*, (2006); 296, p.163–170.

Yuriko N, Noriyoshi S, Kosh A, Yoshito K et Ken-ichi H. Reliable and sensitive analysis of amino acids in the peptidoglycan of actinomycètes using the advanced Marfey's method. *J. Microbiol. Method*, (2007); 70, p. 306-311.

Z

Zaitlin. B; Watson. S.B. Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths, (2006); 40 (9), p. 1741-1753.

Annexe I

Matériel utilisé

- Autoclave (OMRON)
- Balance analytique (RADWAG Model : WLC 0.6/A1/C/2)
- Barreaux magnétiques
- Bec bunsen
- Boite de Petri de 99 mm
- Boite de Petri de 57 mm
- Bain Marie (GFL : Gesellschaft für Labortechnik m.b.H. & Co. D 3006 Burgwedel 1)
- Ecouvillons
- Erlenmeyers
- Etuve à 28, à 37, 40, 60, et 50C° (memmert)
- Micropipette de 1000 µL avec embouts
- Microscope optique (WILL wetzlar)
- Pied à coulisse (STINLESSE HARADEND)
- Pipette Pasteur
- Plaque agitatrice (VELP SCIENTIFICA)
- Rotavapeur (Buchi Ratavapor R-114)
- Spatule
- Tube à essais
- Vortex (VELP scientifica référence : ZX3)

Annexe II

Milieux de culture, d'identification et de caractérisation physiologique

I. Milieux d'isolement

1. Milieu SCA (Starch Casein Agar) (Kuster et Williams, 1964)

Amidon : 10g, Caséine : 0.3g, KNO₃ : 2g, K₂HPO₄ : 2g, NaCl : 2g, MgSO₄ 7H₂O : 0.05g, CaCO₃ : 0.02g, FeSO₄ 7H₂O : 0.01g, Agar 18g, H₂O : 1000 mL, pH 7.2±0.

2. Milieu Mincer

Amidon : 10g, Extrait de levure : 4g, Peptone : 2g, Agar : 18g, H₂O : 1000mL, pH 7.2

II. Milieux d'identification

Les milieux ISP ont été préconisés par l'International *Streptomyces* Project (Shirling et Gottlieb, 1966).

II.1 Milieu ISP1

Tryptone : 5g ; extrait de levure : 3g ; agar : 15g ; eau distillée q.s.p : 1000 ml. pH = 7,2

II.2 Milieu ISP2

Glucose: 4 g ; extrait de levure: 4 g ; extrait de malt: 10 g ; au distillée q.s.p. 1000 mL; agar: 20 g. pH 7,2.

II.3 Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g; solution saline standard: 1 mL ; agar: 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

❖ **Solution saline standard:** FeSO₄, 7H₂O: 0,1 g ; MnCl₂, 4H₂O: 0,1 g ; ZnSO₄, 7H₂O : 0.1g ; eau distillée q.s.p. 100 mL.

II.4 Milieu ISP4

Amidon: 10 g ; K₂HPO₄: 1 g ; MgSO₄, 7H₂O: 1 g ; NaCl: 1 g ; (NH₄)₂SO₄: 2 g ; CaCO₃: 2g ; Solution saline standard (voir ISP3) : 1 mL ; agar : 20 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH 7,2.

II.5 Milieu ISP6

Peptone : 15 g ; protéose peptone 5 g ; citrate de fer ammoniacal 0.5g ; thiosulfate de sodium 0.08, extrait de levure 1 g, H₂HPO₄ 1 g, agar 20g, eau distillée q.s.p. 1000 mL.

III. Milieux de caractérisation physiologique

III.1. Dégradation des glucides

Milieu ISP9 (Milieu de base)

(NH₄)₂SO₄ : 2,64g ; KH₂PO₄ : 2,38g ; K₂HPO₄ : 5,65g; MgSO₄ ; 7H₂O : 1g; Solution saline* : 1 ml; eau distillée : 1000 ml ; agar : 20g; pH : 6,8-7.

- ❖ Solution saline: $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$: 0,64g; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0,11 g; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$: 0,79 g ; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.15 g; eau distillée : 1000 ml.

Annexe III

Tableau II : Etudes des caractères morphologique des 6 souches (*S1*, *S3*, *S5*, *S6*, *S12* et *A1*) sur différents milieux.

milieux Souches	SCA 100%	SCA50%	Mincer100%	Mincer50%
	<i>S1</i>	<p>MA : Colonies de taille moyenne rugueuses aplati du couleur grisâtre clair, aspect de craie MS : Couleur beige Une très bonne croissance avec production des pigments.</p>	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses blanche poudreuses MS : Couleur blanc jaunâtre aplati, sec Une très bonne croissance, pas de production de pigment diffusible.</p>	<p>MA : Colonies de taille moyenne, grisâtre, bombé, sec. MS : Couleur marron foncé Une très bonne croissance, avec production des pigments.</p>
<i>S3</i>	<p>MA : Colonies de taille moyenne aplati, aspect de craie, poudreux du couleur beige MS : Jaune verdâtre. Une très bonne croissance avec production des pigments.</p>	<p>MA : colonies de taille moyenne rugueuses du couleur blanche MS : Verdâtre Une très bonne croissance avec production des pigments.</p>	<p>MA : colonies petites rugueuses du couleur blanche MS : Marron Une bonne croissance avec production des pigments.</p>	<p>MA : colonies de taille moyenne beige, aspect de craie, sec MS : Verdâtres Une très bonne croissance avec production des pigments diffusible.</p>
<i>S5</i>	<p>MA : Colonies petites, rugueuses, visqueuses, légèrement bombés, du couleur blanc jaunâtre sur la surface et rouge orangé sur les parois. MS : Blanc. Une très bonne croissance pas des pigments.</p>	<p>MA : Des petites colonies rugueuses, visqueuses, légèrement aplatis du couleur blanc jaunâtre et production des gouttelettes. MS : Blanc une très bonne croissance, pas de production des pigments.</p>	<p>MA : Des petites colonies rugueuses bombés, du couleur gris clair MS : Rose foncé Une très bonne croissance, avec production des pigments.</p>	<p>MA : Des petites colonies blanche sur une surface orange clair et d'autre marron sur la paroi, aspect cotenaux, bombés, visqueuses. MS : Orange foncé et un marrane clair. Une très bonne croissance et production des pigments..</p>
	<p>MA : Colonies de petites taille visqueuses,</p>	<p>MA : Colonies de petites taille, visqueuses,</p>	<p>MA : Colonies de petite taille, aspect poudreux du</p>	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses du</p>

S6	<p>rugueuses, légèrement aplatis du couleur blanc jaunâtre. MS : N'est pas développé. Une croissance moyenne, pas de production des pigments.</p>	<p>rugueuses du couleur blanc jaunâtre, bombés et production des gouttelettes. MS : Blanc. Une très bonne croissance, pas des pigments diffusibles</p>	<p>couleur beige. MS : Marron clair Une très bonne croissance avec production des pigments.</p>	<p>couleur blanche. MS : Marron clair Une très bonne croissance avec production des pigments.</p>
S12	<p>MA : Colonies de petite r taille rugueuses aspect coutenaux du couleur blanche MS : Marron Une très bonne croissance avec production des pigments.</p> 	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses, aspect coutenaux, bombés du couleur blanche.. MS : Blanc jaunâtre Une très bonne croissance avec production des pigments.</p>	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses, aspect Poudreux, bombés du couleur blanche. MS : Marron foncé Une très bonne croissance avec production des pigments.</p> 	<p>MA : Colonies de taille moyenne rugueuses, aspect de craie, légèrement aplati du couleur blanche. MS : Marron foncé. Une très bonne croissance avec production des pigments.</p> 
A1	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses, poudreux, aplatis du couleur blanche sur la surface verdâtre. MS : Blanc jaunâtre Une très bonne croissance pas des pigments.</p> 	<p>MA : Colonies de taille moyenne arrondies, légèrement bombés du couleur beige verdâtre MS : Blanc Une très bonne croissance pas des pigments.</p> 	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses aplati du couleur crème MS : Jaune Une très bonne croissance avec production des pigments noirs.</p>	<p>MA : Colonies de petite taille rugueuses, sec du couleur crème MS : Jaune Une très bonne croissance avec production des pigments.</p> 

MA : mycélium aérien, MS : mycélium du substrat.

Annexe III

Tableau III : Caractéristiques macromorphologiques des 6 souches après 7 jours d'incubation à 28 °C sur différent milieu de culture.

Milieux de culture	Souches	Caractères culturaux				Croissance
		Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium du substrat	Aspect des colonies	Pigments diffusibles	
ISP1	<i>A1</i>	Gris	Marron clair	Colonies moyennes, rugueuses	+	+
	<i>S1</i>	–	–	–	–	–
	<i>S3</i>	–	–	–	–	–
	<i>S5</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	++
	<i>S6</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	+
	<i>S12</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	+
ISP2	<i>A1</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Colonies moyenne rugueuses	–	++
	<i>S1</i>	Blanc	Marron foncé	Petites colonies rugueuses	+	++
	<i>S3</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	+	++
	<i>S5</i>	Blanc rose et	Rose	Colonies moyennes rugueuses	+	++
	<i>S6</i>	Gris	Marron foncé	Colonies moyennes rugueuses	+	++
	<i>S12</i>	Gris	Marron clair	Colonies moyennes rugueuses	+	++
ISP3	<i>A1</i>	–	–	–	–	–
	<i>S1</i>	–	–	–	–	–
	<i>S3</i>	–	–	–	–	–
	<i>S5</i>	–	–	–	–	–
	<i>S6</i>	–	–	–	–	–

	<i>S12</i>	–	–	–	–	–
ISP4	<i>A1</i>	Blanc jaunâtre	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	+
	<i>S1</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	+
	<i>S3</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuse	–	++
	<i>S5</i>	Rose	Rose	Petites colonies rugueuses	+	+
	<i>S6</i>	Jaune clair	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	++
	<i>S12</i>	Blanc jaunâtre	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	+
ISP6	<i>A1</i>	Blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	++
	<i>S1</i>	–	–	–	–	–
	<i>S3</i>	–	–	–	–	–
	<i>S5</i>	–	–	–	–	–
	<i>S6</i>	blanc	Marron clair	Petites colonies rugueuses	+	+
	<i>S12</i>	blanc	Blanc jaunâtre	Petites colonies rugueuses	–	+

- : pas de croissance, + : croissance moyenne, ++ : bonne croissance.

Résumé

Dans cette présente étude, 6 souches d'actinobactéries d'origine marine ont été étudiées afin de mettre en évidence leur activités antagonistes respectives en mono et en co-cultures. Pour cela, des études macro et micromorphologiques ont été réalisées et ont permis de rattacher les 6 isolats au genre *Streptomyces*.

D'autre part, l'étude physiologique a permis de déterminer leur capacité à se développer en présence de différentes sources de carbone, de métaux lourds, notamment pour l'isolat A1, ainsi qu'en présence de différentes concentrations en NaCl, valeurs de pH et de températures.

L'étude des activités antimicrobiennes des 6 isolats a été évaluée aussi bien par la méthode des cylindres d'agar que celle des puits démontrant une activité plutôt réduite vis-à-vis des germes pathogènes (*V.cholerae*, *S.Typhi*, *A.baumannii*, *L.innocua* et *C.albicans*).

L'étude phénotypique des différentes combinaisons de souches cultivées en co-culture a été entreprise et a révélé la présence d'interactions favorisant l'apparition ou la disparition de certains critères morphologiques telles que la couleur des mycéliums aériens et du substrat. Par ailleurs, l'évaluation de l'activité antagoniste des extraits bruts méthanoliques obtenus par co-culture a été effectuée démontrant une amélioration de l'effet inhibiteur de certains extraits bruts d'une part et une perte d'activité pour d'autres extraits.

Mots clés : Actinobactéries, co-culture, *Streptomyces*, activité antimicrobienne, extraits bruts.

Abstract

In this study, 6 strains of actinobacteria of marine origin were studied in order to demonstrate their respective antagonistic activities in mono and in co-cultures. For this purpose, macro and micromorphological studies were carried out and then linked the 6 isolates to the genus *Streptomyces*.

On the other hand, the physiological study has to determine their capacity to develop in the presence of different sources of carbon, heavy metals, in particular for isolate A1, as well as in the presence of different NaCl concentrations, pH and temperatures.

The study of the antimicrobial activities of the 6 isolates was evaluated both by the agar cylinder method and that of the wells demonstrating a rather reduced activity with respect to pathogenic organisms (*V.cholerae*, *S. Typhi*, *A. Baumannii*, *L.inocua* and *C.albicans*).

The phenotypic study of the different combinations of strains cultured in coculture was undertaken and revealed the presence of interactions favoring the appearance or disappearance of certain morphological criteria such as the color of the aerial mycelia and the substrate. Furthermore, the antagonist activity of the co-cultured methanolic crude extracts was evaluated, demonstrating an improvement in the inhibitory effect of certain crude extracts on the one hand and a loss of activity on other extracts.

Key words : Actinobacteria, co-culture, *Streptomyces*, antimicrobial activity, crude extract.