

*République Algérienne Démocratique et Populaire*  
*Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique*  
*Université Abderrahmane Mira de Béjaia*  
*Faculté Des Sciences de la Nature et de la Vie*  
*Département de Microbiologie Appliquée*

# **Mémoire**

## **En vue de l'obtention du diplôme de Master**

Option Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire, biomédical et à l'environnement

Présenté par

**Warda LALAOUI**

### **Influence de quelques milieux de culture sur la production d'antibiotiques par une souche de *Streptomyces* isolée d'un sol Saharien**

Soutenu le 21 Juin 2012

Devant le jury composé de :

Mme. YOUSFI K.	Maître assistante B à l'Université de Béjaia	Présidente
Mme. BOUDJELLA H.	Maître de conférences A à l'ENS de Kouba, Alger	Promotrice
Mr. NABTI E/H.	Maître de conférences A à l'université de Béjaia.	Examineur
Mme TIGHIDET N.	Maître assistante à l'université de Béjaia.	Examinatrice
Mlle. MEZHOUD H.	Maître assistante à l'université de Béjaia.	Invitée

**Promotion 2011 - 2012**

## **Avant-Propos**

Ce travail qui a été dirigé par Mme H. BOUDJELLA, a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba.

Je tiens à remercier ma promotrice Madame **BOUDJELLA H.**, maître de conférences A à l'E.N.S. de Kouba, de m'avoir encadré et pour la qualité de son encadrement.

Un immense merci à Monsieur le Professeur **Nasserdine SABAOU** et Monsieur **BADJI** pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein de laboratoire LBSM et pour leurs précieux conseils.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Madame **YOUCEFI** qui m'a fait l'honneur de présider les membres du jury.

J'exprime également mes vifs remerciements à Monsieur **NABTI**, à Madame **TIGHIDET** et à Mademoiselle **MEZHOUD** d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'exprime également mes remerciements aux doctorants : Noura, Laila, Amrane et Saïd.

Je tiens à exprimer mes vifs remerciements à Monsieur **ABROUS K.** le chef d'hébergement de la résidence universitaire El Alia, à Madame et Monsieur **BITOUT** et à leurs enfants Hani, Merzak, Sara et Kahina.

Merci à toutes les personnes qui ont participé à l'élaboration de ce projet.

## DEDICACES

*Je remercie Dieu le Généreux pour m'avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.*

*A la mémoire de  
mon oncle ZAHIR  
monsieur BAKLI*

*A mes deux très chers papa et mama*

*qui m'ont toujours aidé et guidé vers les chemins de la réussite qui m'ont transmis le désir d'apprendre et m'ont toujours accompagné tout au long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur compréhension et leurs encouragements, et m'ont permis de devenir ce que je suis, avec tout mon amour et ma reconnaissance.*

*A ma sœur Kamla*

*A ma nièce Salya et mes neveux sabri et Mohammed.*

*A mes frères Salim, Mahdi et Boubekeur.*

*A mes tantes, oncles, cousins et cousines.*

*A toute les deux familles LALAOUI et SAIDANI.*

*A tous mes professeurs du primaire à l'université... en particulier Mme HASSISSANE, Monsieur AMGHAR, Monsieur MOUHEMADI et Monsieur AISSAT.*

*A tous mes amis ...*

## Liste des abréviations

<b>Bs</b>	<i>Bacillus subtilis</i>
<b>Lm</b>	<i>Listeria monocytogenes</i>
<b>Ecl</b>	<i>Enterobacter cloacae</i>
<b>Sa</b>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<b>Kp</b>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
<b>MRSA</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la pénicilline
<b>Se</b>	<i>Salmonella enterica</i>
<b>Pa</b>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
<b>Ec</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>ISP2</b>	International <i>Streptomyces</i> Project
<b>TSB</b>	Tryptic Soy Broth
<b>SSB</b>	Soluble Starch Broth
<b>MCB</b>	Milieu Complexe B
<b>MSS</b>	Milieu Semi-Synthétique
<b>V</b>	Volume
<b>rpm</b>	rotation par minute
<b>µl</b>	Microlitre
<b>ml</b>	Millilitre
<b>m</b>	Mètre
<b>cm</b>	Centimètre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>UV</b>	Ultraviolet
<b>Rf</b>	rapport frontal
<b>mn</b>	Minute
<b>h</b>	Heure
<b>L</b>	Litre
<b>q.s.p.</b>	Quantité suffisante pour
<b>nm</b>	Nano mètre
<b>C.C.M.</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>A</b>	Acétate d'éthyle
<b>B</b>	n-Butanol
<b>D</b>	Dichlorométhane
<b>S. d'Am.</b>	Sulfate d'ammonium

## Liste des figures

n° de la figure	Titre de la figure	Page
<b>Figure 1</b>	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	9
<b>Figure 2</b>	Micromorphologie en microscope optique de la souche EO6 cultivé pendant 14 jours à 30°C sur milieu ISP4	15
<b>Figure 3</b>	La technique des stries croisées.	18
<b>Figure 4</b>	Schéma de la préparation des cultures et des cinétiques.	19
<b>Figure 5</b>	Schéma général de production, d'extraction et de révélation des antibiotiques.	26
<b>Figure 6</b>	Recherche des propriétés antibactériennes de la souche EO6 de <i>Streptomyces</i> sp. par la méthode des stries croisées.	29
<b>Figure 7</b>	Spectre d'activité antimicrobienne de la souche EO6 <i>Streptomyces</i> sp.	30
<b>Figure 8</b>	Cinétique de production des antibiotiques de la souche EO6 cultivée dans différents milieux de culture complexes.	32
<b>Figure 9</b>	Activité antibactérienne de la souche EO6 en milieux complexes SSB, ISP2, Bennett, TSB et MCB.	33
<b>Figure 10</b>	Cinétique de production des antibiotiques de la souche EO6 cultivée sur le milieu MSS additionné en sources de carbone.	36
<b>Figure 11</b>	Activité antimicrobienne de la souche EO6 en milieu MSS additionné en sources de carbone (amidon, fructose, glucose, saccharose, glycérol).	37
<b>Figure 12</b>	Cinétique de production des antibiotiques de la souche EO6 cultivée sur le milieu MSS supplémenté d'amidon varié en sources d'azote.	40
<b>Figure 13</b>	Activité des extraits méthanoliques du mycélium de la souche EO6 de <i>Streptomyces</i> sp. cultivée sur ISP2, Bennett et MSS.	42
<b>Figure 14</b>	Activité des extraits organiques de la souche EO6 <i>Streptomyces</i> sp.	44
<b>Figure 1</b>	Activité des extraits aqueux de la souche EO6 de <i>Streptomyces</i> sp.	45
<b>Figure 16</b>	Antibiographie contre <i>Bacillus subtilis</i> des extraits aux 3	45

	<p>solvants organiques (à droite) et aqueux (à gauche) des cultures de la souche EO6 de <i>streptomyces sp.</i> poussant sur milieu Bennett.</p>	
<b>Figure 17</b>	<p>Localisation par bioautographie avec le solvant B.A.E., des antibiotiques actifs contre <i>Bacillus subtilis</i> provenant des extraits organiques des filtrats de culture et du mycélium de la souche EO6 de <i>Streptomyces sp.</i></p>	47
<b>Figure 18</b>	<p>Localisation par bioautographie avec le système de solvant A.M., des antibiotiques actifs contre <i>Bacillus subtilis</i> provenant des extraits organiques des filtrats de culture et du mycélium de la souche EO6 de <i>Streptomyces sp.</i></p>	48

# Sommaire

<b>Introduction.....</b>	<b>1</b>
--------------------------	----------

## **Revue bibliographique**

<b>I. LES ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>3</b>
----------------------------------	----------

1. Classification des antibiotiques.....	3
2. Mode d'action des antibiotiques.....	3
3. Microorganismes producteurs d'antibiotiques .....	4
4. La résistance aux antibiotiques.....	5

<b>II. LE GENRE <i>STREPTOMYCES</i>, UN ACTINOMYCETE UTILE.....</b>	<b>7</b>
---	----------

1. Aperçu général sur les actinomycètes.....	7
2. Importance des actinomycètes.....	7
3. Ecologie des actinomycètes .....	8
4. Présentation du genre <i>Streptomyces</i> .....	9
5. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> .....	9
6. Intérêt des <i>Streptomyces</i> en tant que producteurs d'antibiotiques .....	10

## **III. FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION**

<b>D'ANTIBIOTIQUES.....</b>	<b>12</b>
-----------------------------	-----------

1. Conditions de culture .....	13
2. Influence des sources nutritionnelles .....	13
3. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation.....	14

<b>IV. LA SOUCHE EO6 DE <i>STREPTOMYCES SP</i>.....</b>	<b>15</b>
---	-----------

1. Isolement et caractéristiques de la souche.....	15
2. Propriétés antagonistes de la souche .....	16

## **Matériel et méthodes**

<b>I. LA SOUCHE EO6 DE <i>STREPTOMYCES SP</i>.....</b>	<b>17</b>
--	-----------

1. Isolement de la souche.....	17
2. Conservation de la souche.....	17

## **II. DETERMINATION DU SPECTRE D'ACTIVITE DE LA SOUCHE**

### **EO6.....17**

1. Bactéries-cibles .....17

2. Technique des stries croisées.....18

## **III. ETUDE DES ANTIBIOTIQUES.....18**

1. Cultures et cinétiques de production des antibiotiques.....18

2. Extraction des antibiotiques.....24

3. Révélation microbiologique.....27

## **Résultats et discussion**

### **I. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE PAR LA TECHNIQUE DES STRIES CROISEES.....29**

1. Résultats.....29

2. Discussion.....30

### **II. ETUDE DE LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES EN MILIEUX DE CULTURE AGITES.....30**

1. Cinétique de production en milieux complexes.....31

2. Cinétique de production avec différentes sources de carbone.....34

3. Cinétique de production avec différentes sources d'azote.....38

4. Discussion générale.....41

### **IV. EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES.....42**

1. Résultats.....42

1.1. Extraction à partir du mycélium.....42

1.2. Extraction à partir du filtrat de culture.....43

### **V. DETECTION DES ANTIBIOTIQUES PAR BIOAUTOGRAPHIE.....46**

1. Résultats.....46

2. Discussion .....49

## **Conclusion et perspectives.....50**

# **Introduction**

# **Synthèse bibliographique**

**Matériel**  
**et**  
**Méthodes**

**Résultats**  
**et**  
**Discussion**

# **Conclusion**

# **Références bibliographiques**

# **Annexes**

Depuis l'apparition des premiers agents antibactériens, notamment la pénicilline et les sulfamides, les bactéries n'ont cessé de s'adapter à l'environnement hostile que nous leur avons imposé par l'utilisation massive d'antibiotiques. Cette adaptation s'est traduite par le développement de la résistance bactérienne (**Alanis, 2005**) avec en particulier une évolution vers la multirésistance de certaines bactéries pathogènes, ce qui a eu pour conséquence, la perte progressive de l'efficacité des antibiotiques utilisés en thérapie anti-infectieuse. Ainsi, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques (**Demain, 2010 ; Donadio et al., 2002 ; Hancock et Strohl, 2001**). La recherche de molécules actives à partir du milieu naturel est l'une d'entre-elles (**Singh et Greenstein, 2000**).

La plupart des antibiotiques issus du milieu naturel proviennent des microorganismes du sol (**Fishbach et Walsh, 2009 ; Demain et Sanchez, 2009 ; Clardy et al., 2006**). Parmi ceux-ci, les actinomycètes sont les plus grands producteurs de ces molécules (**Solecka et al., 2012 ; Takahashi et Omura, 2003**). Le genre *Streptomyces* qui constitue à lui seul, 80 à 95% des actinomycètes telluriques (**Hopwood, 2007 ; Watve et al., 2001**), sécrète près de 80% des antibiotiques naturels commercialisés (**Thakur et al., 2007**). De nombreux laboratoires dans le monde se sont efforcés de diversifier les sources d'actinomycètes en explorant des échantillons provenant des habitats les plus exotiques (**Donadio et al., 2002 ; Gupte et al., 2002**), et ce, dans l'espoir de découvrir de nouvelles molécules.

Les sols sahariens d'Algérie représentent un écosystème particulier. Dans le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM, ex. LRPBVB, Laboratoire de Recherche sur les Produits Bioactifs et la Valorisation de la Biomasse, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger), l'exploration des sols sahariens a montré leur richesse et leur biodiversité en genres d'actinomycètes (**Sabaou et al., 1998 ; Boudjella, 1994**).

Dans le contexte de recherche de nouvelles substances antimicrobiennes, une nouvelle souche d'actinomycète désignée EO6 a été isolée d'un sol saharien, et identifiée au genre *Streptomyces*. Dans le présent travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne de la souche. Nous proposons de mettre en évidence l'influence de quelques milieux de culture sur la production d'antibiotiques.

Ce travail a pour objectif la détermination d'un milieu de culture qui permettrait une production optimale de l'activité antibiotique par la souche EO6. Pour cela, nous comptons :

- Tester différents milieux de culture complexes pour la production des antibiotiques.

- Tester différentes sources de carbone sur un milieu semi-synthétique standard afin de définir la meilleure source de carbone.

- Tester différentes sources d'azote sur le même milieu semi-synthétique.

A travers les résultats de cinétiques collectées aux cours des différentes expérimentations, nous tenterons d'établir les milieux de culture permettant la production optimale des antibiotiques.

Ainsi, le manuscrit compte trois chapitres. Le premier, fait tout d'abord état d'une revue bibliographique sur les actinomycètes en général et sur le genre *Streptomyces* en particulier. Nous avons présenté leur importance dans les différents domaines (industriel, écologique, agro-alimentaire, vétérinaire et médical) avec un intérêt particulier consacré à leur grande aptitude à produire des antibiotiques. En ce qui concerne cette dernière propriété, nous avons traité succinctement les conditions de culture contrôlant leur production.

Le second chapitre a trait aux différents matériel et méthodes utilisés, et le troisième, aux résultats obtenus et à leurs discussions. Ce dernier comprend l'étude de la production des antibiotiques dans différents milieux de culture, leur extraction et leur détection par révélations microbiologiques.

Pour ce chapitre, nous avons réalisé une synthèse bibliographique où nous avons essayé de relever les points essentiels traités dans notre travail. Nous développons ci-après une rétrospective sur les *Stryptomycetes* en tant que producteurs d'antibiotiques et sur les conditions de culture de production.

## I. LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (**Bu'lock, 1965**).

### 1. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques sont biosynthétisés par des micro-organismes à partir de substances organiques simples comme les sucres, les acides aminés, les bases puriques ou pyrimidiques et les acides gras activés. La classification des antibiotiques peut reposer sur plusieurs critères : origine, mode d'action, spectre d'action, micro-organismes producteurs, structure chimique, voies de biosynthèse,...

La classification des antibiotiques basée sur leurs structures chimiques fait apparaître neuf familles (**Berdy *et al.*, 1987 ; Becking, 1974**) : (1) sucres et sucres aminés, (2) lactones macrocycliques, (3) quinones et antibiotiques apparentés, (4) acides aminés et peptides, (5) antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène, (6) antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote, (7) antibiotiques alicycliques, (8) antibiotiques aromatiques et (9) antibiotiques aliphatiques.

### 2. Mode d'action des antibiotiques

A la différence des antiseptiques et des désinfectants, les antibiotiques agissent en général de façon très spécifique sur certaines structures de la cellule bactérienne ; cette grande spécificité d'action explique pourquoi les antibiotiques sont actifs à très faible concentration. Cette action s'exerce selon les molécules sur des sites variés :

- Sur la paroi bactérienne : en inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie

sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne, (**Lagier, 1998**).

- Sur la membrane cellulaire : en désorganisant sa structure et son fonctionnement, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.

- Sur les ribosomes : ce qui entraîne l'arrêt de la biosynthèse des protéines ou la formation de protéines anormales.

- Sur l'ADN : en empêchant sa réplication et de la biosynthèse protéique.

- Autres : en agissant tant qu'anti métabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries). (**Cuq, 2008 ; Puyt, 2006 ; Puyt J.D. 2002 ; Cohen et Jaquot, 2001 ; Yala, Merad et al. 2001**).

### 3. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

**Bérdy (2005)** rapporte que parmi les 22500 molécules biologiquement actives synthétisées par des microorganismes, 45% sont produites par les actinomycètes, 38% par les champignons et 17% par les bactéries unicellulaires.

Les *Streptomyces* sont à l'origine de la majorité d'entre eux : plus de 50% du total des antibiotiques et près de 80% de ceux sécrétés par les actinomycètes. Parmi les genres producteurs autres que *Streptomyces*, nous pouvons citer *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Actinoplanes* et *Streptoverticillium* (environ 18% des antibiotiques d'origine actinomycétale). Les genres les plus rares ne produisent relativement que très peu de molécules actives (près de 3%).

Le tableau 1 indique les principales familles d'antibiotiques sécrétés par divers genre d'actinomycètes.

**Tableau 1** : Principales familles d'antibiotiques secrétées par divers genres d'actinomycètes  
(In : Hacene, 1992)

Genre d'actinomycètes	Famille d'antibiotiques								
	OS	BL	PEP	TC	ANC	ML	PO	AS	NUC
<i>Streptomyces</i>	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Micromonospora</i>	+	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Nocardia</i>	+	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>Actinomadura</i>	+	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Actinoplanes</i>	-	-	+	-	+	+	+	-	-
<i>Streptoverticillium</i>	-	-	+	-	-	+	+	-	-
<i>Saccharopolyspora</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Streptosporangium</i>	-	-	+	-	+	-	-	+	-
<i>Dactylosporangium</i>	+	-	-	-	-	-	+	-	+
<i>Actinosynnema</i>	-	+	+	-	-	+	-	-	-
<i>Kitasatosporia</i>	+	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Microbispora</i>	-	-	+	-	+	-	-	-	-
<i>kibdellosporangium</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	-

**Note** : OS : oligosides ; BL :  $\beta$ -lactamines ; PEP : peptides ; TC : tétracyclines ;

ANC : anthracyclines ; ML : macrolides ; PO : macrolides polyéniques, AS : ansamycines ; NUC : nucléosides, NC = genre non reconnu en 1974.

#### 4. Résistance aux antibiotiques

##### 4.1. Qu'est ce que la résistance aux antibiotiques ?

La résistance est un phénomène lourd de conséquences, qui peut être naturelle, ou acquise consécutivement à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou plasmidique (mutations spontanées - 20% des résistances - ou échange par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon - 80% des résistances). Ainsi, de nombreux microorganismes pathogènes classiques développent des résistances multiples aux antibiotiques.

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques en se rendant imperméable à leur pénétration, en produisant des enzymes capables de les inactiver et en modifiant la structure de leurs cibles.

## 4.2. Origine de la résistance aux antibiotiques

Devant l'augmentation de la densité de la population humaine dans certaines zones géographiques, l'usage des différents traitements s'est accru. Le **Dr Harold C. Neu** était l'un des premiers chercheurs à dénoncer l'utilisation abusive et inutile des antibiotiques dans de nombreux cas (**Neu, 1992**). De nombreuses études dans le monde appellent à réduire la consommation d'antibiotiques afin de diminuer la résistance aux antibiotiques (**Friedman et Whitney, 2008**).

L'un des antibiotiques victimes de la résistance bactérienne est la pénicilline. Alors que cet antibiotique est mis en évidence par Alexander Fleming en 1928, on observe déjà des bactéries résistantes à ce  $\beta$ -lactame dès 1930. Les bactéries résistent à la pénicilline de trois façons différentes : par diminution de la perméabilité, par modification des PBP (Penicillin Binding Protein) ou le plus souvent par hydrolyse du noyau lactame par les  $\beta$ -lactamases. En 1996, les pénicillines étaient encore un traitement efficace contre le pneumocoque ; en 2001, les chercheurs ont constaté que celui-ci présentait une résistance importante envers ces antibiotiques.

## 4.3. Solutions envisagées

Parmi les stratégies de recherche de nouveaux antibiotiques, celles qui consistent à les chercher dans les produits naturels. Comme les microorganismes et particulièrement les actinomycètes sont les principaux producteurs, les chercheurs explorent des écosystèmes particuliers (désert, grottes, volcan, lac salé, ...) avec l'espoir de découvrir de nouvelles souches de microorganismes capables de produire de nouvelles molécules antibiotiques.

A ce propos, les chercheurs estiment que seul 1% des microorganismes vivants sur terre a été découvert, ce qui laisse place à la découverte d'une multitude de nouvelles espèces.

**Smirnov et al. (2008)** estiment qu'il existe un réservoir immense et non exploité de diversité métaboliques au sein des milliers d'espèces appartenant à la famille des actinomycètes et plus particulièrement, au genre *Streptomyces*.

Ainsi, les chercheurs pensent que ces souches microbiennes vivant dans des écosystèmes particuliers doivent posséder des métabolismes particuliers et différents et donc, la capacité de produire de nouvelles molécules. Par ailleurs, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques, les chercheurs s'intéressent aussi bien au genre

*Streptomyces* (le plus abondant, le plus étudié et le plus grand producteur), qu'à des genres rares provenant de milieux extrêmes (**Bouras et al., 2008 ; Barakate et al., 2002 ; Donadio et al., 2002 ; Moncheva et al., 2002 ; Naidenova et Vladimirova, 2002 ; Lazzarini et al., 2000 ; Sabaou et al., 1998 ; Boudjella, 1994**). Ainsi, de nombreuses recherches sont menées à travers le monde pour découvrir de nouveaux microorganismes.

## II. LE GENRE *STREPTOMYCES*, UN ACTINOMYCETE UTILE

### 1. Aperçu général sur les actinomycètes

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

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

### 2. Importance des actinomycètes

Les actinomycètes sont connus pour la richesse de leur métabolisme secondaire par la production d'une étonnante diversité de métabolites tels que les antibiotiques, les enzymes, les vitamines, et d'autres substances à activités antitumorales, antiparasitaires, herbicides, insecticides... etc.

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire. Le métabolisme primaire regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteur et

l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex. : acides aminés) en macromolécules (ex. : protéine).

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonction apparente dans le métabolisme cellulaire. Il existe 23000 métabolites secondaires produits par les microorganismes, plus de 10000 sont produits par les actinomycètes, ce qui représente 45% du total des métabolites microbiens, et même 80%, si on ne considère que les composés ayant un usage pratique (**Bérdy, 2005**).

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

### 3. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels et la plupart d'entre eux sont strictement saprophytes. Ils sont retrouvés dans de nombreux biotopes tels que le sol, le fumier, le compost, les fourrages, les grains, (**Dommergues et Mangenot, 1970**) l'air, et l'eau (lacs, rivières, ruisseaux, mers et océans), mais c'est dans le sol qu'ils abondent le plus (**Goodfellow et Williams, 1983 ; Cross, 1981**).

Dans le sol, les actinomycètes sont présents à partir de la surface jusqu'à plus de 2 m de profondeur, la zone la plus riche étant comprise entre 2 et 20 cm (**Breton et al. 1989**). Ils sont plus nombreux que les champignons mais moins abondants que les autres bactéries. Leur densité par gramme de sol sec oscille souvent entre 1 et 10 millions de propagules (**Lacey, 1973**). Le genre *Streptomyces* représente souvent plus de 90% des souches d'*Actinomycetales* de la plupart des sols (**Lechevalier et Lechevalier, 1967**).

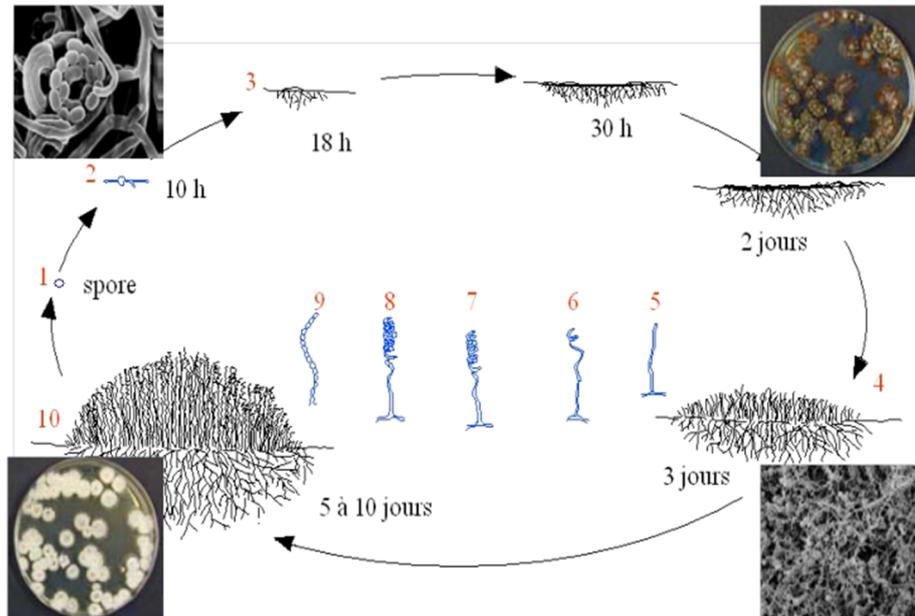
Dans les sols sahariens, les actinomycètes constituent 15 à 60% de la microflore totale et parfois même jusqu'à 85%. Ce pourcentage augmente jusqu'à 91% dans les horizons situés entre 1 et 2 m de profondeur avec une prédominance des *Streptomyces* et quelque fois des *Micromonospora*, des *Actinomadura* et des *Nocardioïdes* (**Sabaou, et al. ; 1998 ; Sabaou et al. 1992 ; Sabaou et al., 1980**).

#### 4. Présentation du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* (du grec *Streptos* : courbé, tordu et *Myces* : moisissure) appartient au groupe des Actinomycètes, sous-groupe des Streptomycètes. Les *Streptomyces* représentent le genre majoritaire des *Streptomycètes* (95,34%). Il s'agit de bactéries du sol filamenteuses, dont les hyphes, de longueur variable, ont un diamètre compris entre 0,5 et 2,0  $\mu\text{m}$ . Ces bactéries sont aérobies strictes et à Gram positif.

#### 5. Cycle de développement des *Streptomyces*

Le cycle de développement de *Streptomyces* débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non septées et plurinucléées, ramifié et ancré dans le milieu solide, appelé mycélium du substrat. Sur celui-ci, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninucléées comme le montre la figure 1 (Flårdh et Bruttner,2009).



**Figure 1** : Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985)

Le mycélium aérien présente selon les espèces, des filaments de formes variées : droits (*Rectus Flexibilis*), incurvés (*Retinaculum Apertum*) ou spiralés (*Spira*). Ces filaments présentent des conidies non mobiles en chaînes (jusqu'à 50 conidies) et ont une surface lisse, épineuse ou verruqueuse.

La paroi est de type I (isomère LL de l'acide diaminopimélique) et ce genre ne contient pas de sucres caractéristiques ni d'acides mycoliques, son taux en G+C varie de 68 à 78%.

## 6. Intérêt des *Streptomyces* en tant que producteurs d'antibiotiques

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs d'antibiotiques. Plus des deux tiers des quelques sept mille antibiotiques isolés jusqu'à ces dernières années sont produits par des actinomycètes et surtout par le genre *Streptomyces*. Ils représentent la plus grande source d'antibiotiques naturels utilisés dans plusieurs domaines thérapeutiques.

Six mille antibiotiques avaient été identifiés chez les actinomycètes dont cinq mille chez les *Streptomycètes* sur un total de 9000 antibiotiques connus (**Goodfellow et O'Donnell, 1992**). Environ 500 nouveaux antibiotiques sont découverts chaque année dont une part importante provient des *Streptomycètes* qui produisent encore à l'heure actuelle plus de 60% de ces molécules (**Demain, 2000**). Quelques exemples d'antibiotiques sécrétés par les *Streptomyces* sont donnés dans le tableau 2.

**Tableau 2** : Exemples d'antibiotiques sécrétés par les *Streptomyces*.

Antibiotique	Espèce productrice	Activité (Site ou mode d'action)	Référence
Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	Les bactéries à Gram négatif (La synthèse des protéines)	<b>Selman Waksman, 1944</b>
Néomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	à large spectre (La synthèse des protéines)	<b>Selman Waksman, 1949</b>
Erythromycine	<i>Streptomyces erythreus</i>	Les bactéries à Gram positif ( La synthèse des protéines)	<b>Mc Guire, 1952</b>
Spiramycine (= rovamycine)	<i>S. ambofaciens</i>	Bactéries G+ et G-, chlamydies, mycoplasmes et taxoplasmes	<b>Pinneret-Sindico, 1954</b>
Kasugamycine	<i>Streptomyces kasugaensis</i>	Bactéricide et fongicide (Inhibiteur de biosynthèse de protéine)	<b>Umezawa <i>et al.</i>, 1965</b>
Platensimycine	<i>Streptomyces platensis</i>	Bctéries G+ (la synthèse des acides gras)	<b>Jun Wang <i>et al.</i>, 2006</b>

### 6.1. Autres intérêts des *Streptomyces*

Outre la production d'antibiotiques, les *Streptomyces* ont la capacité de produire une large gamme de métabolites qui ont des applications importantes dans les domaines : industriel (pharmaceutique et agroalimentaire), agronomique et en biologie moléculaire (endonucléases de restriction).

#### 6.1.1. Importance dans les domaines pharmaceutique et vétérinaire

Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits sécrétés par les actinomycètes (**Moearsku, 1998**). Ils peuvent avoir des applications médicales (neuroaminidases, estérases et cholestérol oxydase), ou vétérinaires, comme additif nutritionnel pour le bétail (**Oestergaard *et al.*, 2001**). Des antiviraux (**Kim *et al.*, 1989**), des immunosuppresseurs (rôle important dans la transplantation d'organes), des antihistaminiques sont également produits (**Matsuo *et al.*, 2003** ; **Eder *et al.*, 2002** ; **Kim *et al.*, 1998** ;

**Murakata et al., 1998 ; Papp et al., 1992). Umezawa (1988)** rapporte qu'une molécule produite par *S. tsukubaensis* possède une activité immunosuppressive semblable à celle de la cyclosporine, utilisée dans la chirurgie de la transplantation des organes.

### **6.1.2. Importance dans le domaine agroalimentaire**

Les *Streptomyces* jouent un rôle important en sécrétant des enzymes dont certaines sont utilisées dans l'industrie agroalimentaire (glucose isomérase), dans celle des détergents (protéases) (**Moreira, 2002**), d'autres substances utilisés pour la protection de certains fromages (**Vandamme, 1985 ; Block, 1983**) et des promoteurs de croissance utilisés comme additif alimentaire aux animaux d'élevage.

### **6.1.3. Importance dans le domaine agronomique**

En agriculture, les *Streptomyces* ont un rôle important dans le recyclage de la matière organique grâce à leur capacité à dégrader des substances très dures et incapables d'être décomposées par les bactéries non mycéliennes et les champignons : les polymères complexes, les polysaccharides, les lignocelluloses, la chitine, etc. (**Mc carthy et Williams, 1992 ; Goodfellow et Williams, 1983 ; Lechevalier, 1981**). Ils participent donc activement à la fertilisation des sols. Leur pouvoir antagoniste prononcé leur confère un rôle dans la distribution écologique des microorganismes et dans la lutte biologique contre certains agents phytopathogènes du sol (**Goodfellow et Williams, 1983**).

Les *Streptomyces* sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles (insecticides) et les mauvaises herbes (herbicides, comme l'herbimycine produite par *Streptomyces hygroscopicus*) (**Omura et al., 2006**).

## **III. FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES**

De nombreux facteurs peuvent affecter la production microbienne des antibiotiques, tels que la nature de l'inoculum, la composition du milieu de culture et les conditions de culture (pH, température, aération, temps d'incubation,...). Généralement cette production de

métabolites secondaires est soumise à une régulation influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice qui à leur tour synthétisent des métabolites intermédiaires servant de précurseurs pour la synthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. Le niveau de production de ces derniers notamment chez les actinomycètes dépend à la fois de la quantité des 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 (**Strub, 2008 ; Benslimane, 2006 ; Laprent et Sanglier, 1992**).

## **1. Conditions de culture**

### **1.1. Choix du milieu de culture de production**

Un milieu doit être complet, qu'il soit synthétique (de composition strictement définie) ou complexe (comportant des farines, des extraits de viande...) et doit contenir une source d'énergie et de carbone, une source d'azote, des sels minéraux et des oligo-éléments (**Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992**).

### **1.2. Inoculum**

L'inoculum est le matériel vivant (spores, cellules, hyphes) servant à inoculer un milieu de propagation ou de production. De la qualité et de la quantité d'inoculum va dépendre le succès de toute expérience et de toute production biotechnologique. L'inoculum de base doit être soigneusement conservé. Il faut aussi qu'il soit pur, d'excellente qualité et en quantité suffisante à un stade optimal de développement (**Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992**).

## **2. Influence des sources nutritionnelles**

Comme le nombre de souches productrices d'antibiotiques est trop diversifié et les voies de biosynthèse sont trop multiples, des règles uniques ne peuvent pas être dégagées.

D'une façon générale, les conditions optimales pour la production des antibiotiques ne sont pas nécessairement identiques à celles permettant une bonne croissance. Les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance, et varient avec la souche utilisée et le métabolite secondaire synthétisé.

### 2.1. Influence de la source de carbone

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, dextrines) (**Lounès et al., 1995 ; Lebrihi et al., 1988**) et les oligosaccharides que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol.

### 2.2. Influence de la source d'azote

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe nettement sur les rendements de production. L'action peut se situer au niveau du taux de croissance et au niveau plus direct de la formation ou du fonctionnement des enzymes responsables du métabolisme secondaire.

Cette source peut être apportée sous forme de sels, de produits au cours du métabolisme d'acide aminés, de protéines ou de nitrates (**Aharonowitz, 1980**).

De nombreuses synthèses d'antibiotiques peuvent être inhibées par des excès d'ions ammonium ou d'autres sources azotées rapidement métabolisables. Exemple de l'antibiotique Candihexine de *Streptomyces viridoflavum* et Céphamycine de *Streptomyces clavuligerus* dont la synthèse est réprimée par des sources d'azotées aisément assimilables (**Demain, 1982 ; Aharonowitz, 1980**).

L'effet négatif des sources d'azote peut être éliminé par le choix dans le milieu de culture d'un substrat naturel approprié (farine de soja) ou d'acides aminés lentement métabolisés (cas de la proline pour la production de streptomycine).

### 3. Effet du pH, de la température, de l'agitation 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**). **Tanaka (1992)** montre que les optima de pH et de température pour la production d'antibiotiques sont généralement plus bas que celle pour la croissance. Il faut noter que ces deux conditions sont

en fonction des bactéries actinomycétales, des bactéries-tests, et des milieux de culture. Il a été rapporté par **Dumenil et Sanglier (1989)** que les zones optimales pour le métabolisme secondaire sont généralement plus étroites que pour la croissance et sont fonction de la souche étudiée. Toutes les productions de métabolites secondaires se déroulent en conditions aérobies. La concentration en oxygène dissous constitue un facteur essentiel pour l'optimisation des fermentations. La quantité d'oxygène dissous dépend, non seulement de la quantité d'air injectée dans le milieu, mais aussi du type d'agitation mécanique, de la vitesse d'agitation et des propriétés rhéologiques et hydraulique du milieu.

#### **IV. LA SOUCHE EO6 DE *STREPTOMYCES* SP.**

##### **1. Isolement et caractéristiques de la souche**

Cet actinomycète a été isolé à partir d'un échantillon de sol prélevé au niveau d'une palmeraie à El Oued (oasis du Nord-Est algérien). Son mycélium aérien (MA) est gris, bien produit sur les milieux ISP4 et ISP3 et peu ou pas produit sur les autres milieux. Celui du substrat (MS) est beige clair non caractéristique. Un pigment soluble brun orangé est produit sur le milieu ISP3 et brun grisâtre sur ISP4.

Sa micromorphologie et la chimie de certains constituants cellulaires sont typiquement ceux du genre *Streptomyces* auquel elle est rattachée (**Khebizi, 2010**). Le MA produit des chaînes de spores (10 à 50 spores par chaîne) portées par de courts sporophores. Ces chaînes sont disposées en spirales (type « spira » = S) de 3 à 6 tours (figure 2).



**Figure 2 :** Micromorphologie en microscope optique de la souche EO6 cultivé pendant 14 jours à 30°C sur milieu ISP4 (issu de **Khebizi, 2010**).

L'analyse des constituants cellulaires a montré que la souche possède le chimiotype IC (caractérisé par la présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique et de la glycine, et ne possède pas de sucres taxonomiquement importants dans les hydrolysats cellulaires). Les phospholipides sont de type PII contenant de la phosphatidyléthanolamine (PE).

Dans l'étude physiologique, la souche a dégradé l'amidon, l'arabinose, le xylose, l'inositol, le mannitol, le fructose, le rhamnose, le saccharose, le galactose, et le glucose. Le raffinose est peu dégradé. D'un point de vue phylogénétique, la souche EO6 est différente des espèces types de *Streptomyces*. Elle se détache nettement de l'espèce-type *S. werraensis* la moins différente (taux de similitude de 99,03%).

## **2. Propriétés antagonistes de la souche**

Les propriétés antagonistes de la souche EO6 de *Streptomyces* sp. ont été déterminées par Khebizi (2010) sur un nombre restreint de germes-cibles. La souche présente un spectre d'action assez large touchant aussi bien les bactéries (à Gram positif et à Gram négatif), que les champignons filamenteux et unicellulaires (levures).

## I. LA SOUCHE EO6 DE *STREPTOMYCES* SP.

### 1. Isolement de la souche

La souche d'actinomycète utilisée dans notre travail provient du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de Kouba. Elle a été isolée par Khebizi (2010) à partir d'un échantillon de sol saharien collecté à EL Oued et prélevé au niveau d'une palmeraie. L'isolement a été effectué par la méthode des suspensions-dilutions (**Rapilly, 1968**) sur milieu « chitine-vitamines B-agar » (**Hayakawa et Nonomura, 1987**), additionné de chloramphénicol (25 µg/ml).

La taxonomie de la souche a été étudiée par Khebizi (2010) par le biais d'études morphologiques, chimiques, physiologiques et phylogénétiques. Elle a été identifiée au genre *Streptomyces*.

### 2. Conservation de la souche

La souche EO6 est conservée à 4°C, sur le milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) incliné (en tubes à vis). Ce milieu permet une bonne croissance et une bonne sporulation de la souche et des actinomycètes en général.

## II. DETERMINATION DU SPECTRE D'ACTIVITE DE LA SOUCHE EO6

### 1. Bactéries-cibles

L'activité antibactérienne de la souche EO6 est déterminée contre les bactéries-tests suivantes :

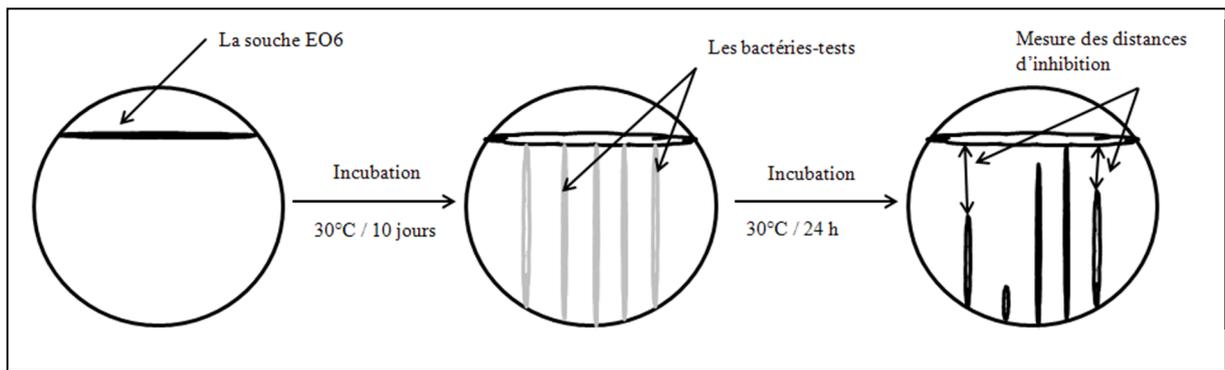
- **bactéries à Gram négatif** : *Escherichia coli* ATCC 25922 (*Ec*), *Enterobacter cloacae* (*Ecl* 052), *Enterobacter cloacae* (*Ecl* 064), *Enterobacter cloacae* (*Ecl* 068), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (*Pa*), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp* 067), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp* E40), *Salmonella enterica* (*Se* E32).
- **bactéries à Gram positif** : *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (*Bs*), *Listeria monocytogenes* (*Lm*), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (*Sa*), *Staphylococcus aureus* (*Sa* 045) et MRSA (*Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline).

Les bactéries (*Ecl* 052, *kp* E40, *Se* E32, *Ecl* 064, *Ecl* 068, *Kp* 067, *Sa* 045 et MRSA.) pathogènes ont été prélevées dans les hôpitaux chez des patients soumis à une antibiothérapie ou à partir du matériel médical (**Touati, 2006**). La souche *Lm.* est obtenue auprès du laboratoire

du lait et des probiotiques de l'université A/Mira de Béjaia (**Bendali**). Les souches *Ec*, *Bs*, *Pa* et *Sa* font parties de la collection des souches du laboratoire LBSM.

## 2. Technique des stries croisées

L'activité antimicrobienne de la souche EO6 est évaluée par la méthode des stries croisées (**Williston et al., 1947 ; Waksman, 1945**) sur le milieu ISP2 (**Shirling et Gottlieb, 1966**) solide (à 18 g/L d'agar). Cette méthode consiste à ensemencer la souche d'actinomycète en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les souches-test sont ensemencées perpendiculairement à l'actinomycète. L'effet de ce dernier est caractérisé par une inhibition partielle ou totale de la croissance des germes-tests. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre la bordure de la souche-cible et celle de l'actinomycète après 24 h d'incubation. Les étapes de cette méthode sont représentées par la figure 3.



**Figure 3** : La technique des stries croisées.

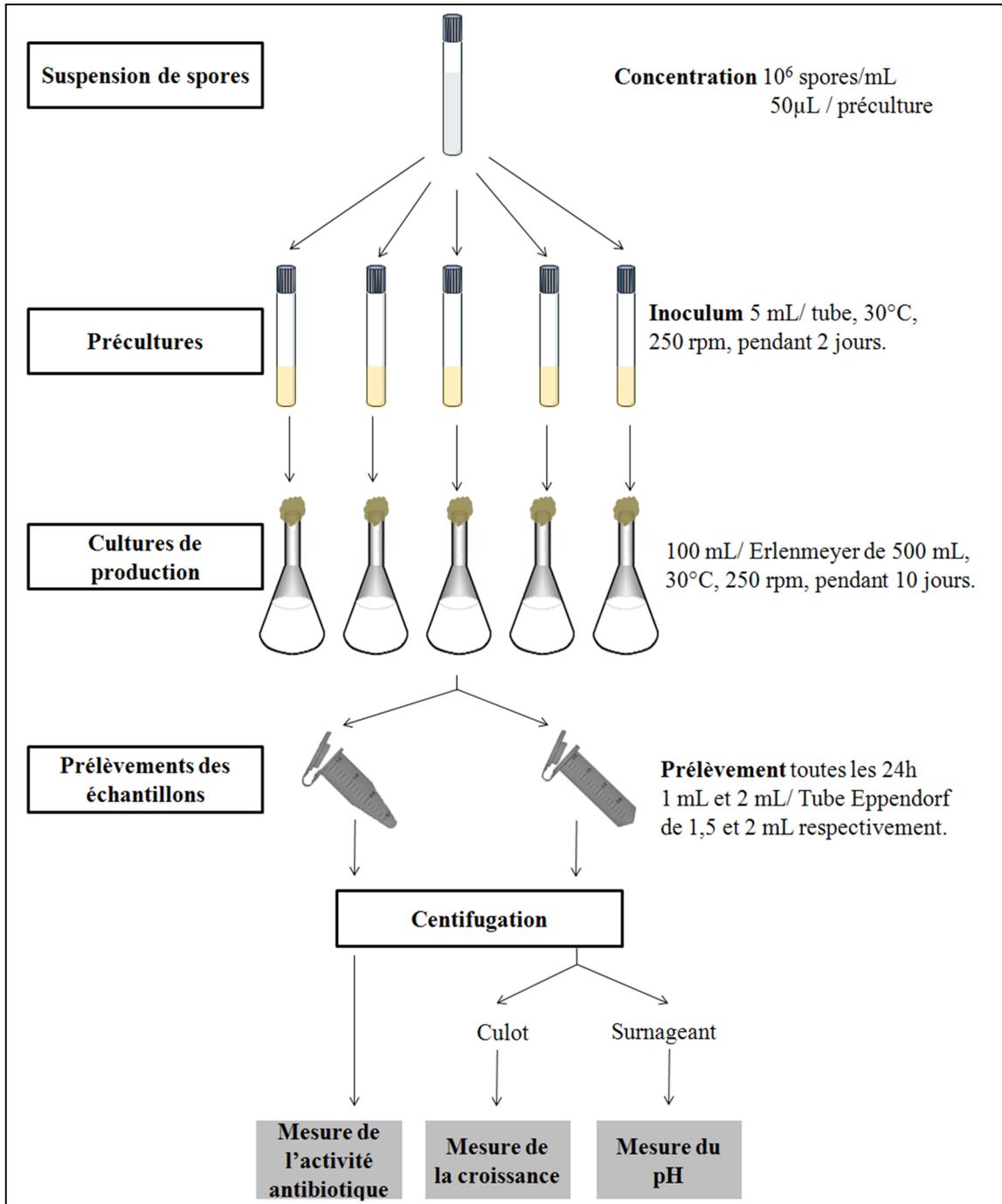
## III. ETUDE DES ANTIBIOTIQUES

Pour l'étude des activités antibactériennes produites par la souche EO6, nous avons suivi le protocole dont le schéma général est illustré par la figure 5, et qui représente les différentes étapes de culture, des cinétiques, et de détection des antibiotiques.

### 1. Cultures et cinétiques de production des antibiotiques

Les cultures de production et les cinétiques ont été réalisées en fioles d'Erlenmeyer de 500 ml (à raison de double pour chaque milieu). La figure 4 décrit les étapes suivies pour chaque

milieu de culture. Au cours des cinétiques, nous avons mesuré l'activité antibactérienne, la croissance et le pH.



**Figure 4** : Schéma de la préparation des cultures et des cinétiques.

### 1.1. Les milieux de culture de production

Les cinétiques de production des antibiotiques ont été menées d'abord sur 5 milieux de culture complexes. Puis, un milieu semi-synthétique est utilisé pour étudier l'influence de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques. Le but est de choisir un milieu de culture permettant une production optimale des antibiotiques. Chaque expérience est réalisée en double.

Le pH des milieux est ajusté à 7,3 (avec NaOH 0,1 N et HCl 0,1 N).

#### 1.1.1. Les milieux complexes

Cinq milieux de culture complexes sont testés (ISP2, Bennett, TSB, SSB et MCB). Ces milieux de culture sont préconisés par plusieurs auteurs pour la production d'antibiotiques par les actinomycètes, et particulièrement par les espèces du genre *Streptomyces*.

##### - Le milieu ISP2 « International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glucose.....	4 g
Extrait de levure .....	4 g
Extrait de malt.....	10 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1000 ml
pH 7,3	

##### - Le milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955)

Glucose.....	10 g
Peptone de caséine.....	2 g
Extrait de levure.....	1 g
Extrait de viande.....	1 g
Eau distillée.....	q.s.p. 1000 ml
pH 7,3	

##### - Le milieu TSB « Tryptic Soy Broth » (Mellouli *et al.*, 2003)

Peptone de caséine.....	17 g
peptone de soja.....	3 g
Chlorure de sodium.....	5 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,5 g
Glucose.....	2,5 g
eau distillée.....	q.s.p. 1000 ml
pH 7,3	

- **Le milieu SSB** « Soluble Starch Broth » (**Bouras, 2005**)

Amidon soluble.....	5 g
Glycerol.....	10 g
Extrait de levure .....	4 g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,4 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,2 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
Eau distillée.....	1000 ml
pH 7,3	

- **Le milieu MCB\*** « Milieu Complexe B » (**Benslimane, 1996**) modifié\*\*

Dextrines.....	12 g
Extrait de levure.....	12 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
MgSO <sub>4</sub> .....	1 g
CaCO <sub>3</sub> .....	5 g
NaCl.....	20 g
huile d'olive.....	5 mL
eau distillée.....	q.s.p. 1000 ml
pH 7,1	

\* : Le milieu MCB a été utilisé par « Rhône-Poulenc-Rorer » pour l'étude de la production de la spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*.

\*\* : La modification a porté sur l'huile de maïs qui a été remplacée dans notre cas, par de l'huile d'olive.

**1.1.2. Le milieu semi-synthétique (Bouras, 2006)**

Le milieu MSS (Milieu Semi-Synthétique) est utilisé pour étudier l'effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques. Une cinétique est suivie pendant 10 jours.

- **Composition du milieu MSS\***

(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .....	2 g
NaCl.....	2 g
K <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	1 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....	0,5 g
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O.....	0,2 g

CaCO<sub>3</sub>..... 2 g  
 Eau distillée..... q.s.p. 1000 ml

pH 7,3

\* : Le milieu MSS est additionné selon les cas (voir paragraphes suivants), d'une source d'azote (extrait de levure, 2 g/l) ou d'une source de carbone (amidon, 10 g/l).

#### 1.1.2.1. Les sources de carbone

Afin de rechercher une source de carbone permettant une production optimale des antibiotiques, cinq sources de carbone sont testées. Il s'agit du : glucose, glycérol, fructose, amidon et saccharose, ajoutés chacun au milieu MSS à raison de 1 % poids/volume (10 g/l). D'après les résultats de l'étude physiologique (étude taxonomique) réalisée par Khebizi (2010), ces sources de carbone sont toutes utilisées par la souche EO6.

Dans le cas de l'étude des sources de carbone, de l'extrait de levure (à 2 g/l) est ajouté comme source d'azote. A la fin de cette cinétique, la source de carbone permettant une production optimale sera ajoutée au même milieu de culture, pour étudier l'influence de quelques sources d'azote sur la production d'antibiotiques.

#### 1.1.2.2. Les sources d'azote

Cinq composés d'origine inorganique, organique et organique complexe, sont testés comme sources d'azote. Ce sont : le sulfate d'ammonium, l'asparagine, la leucine, la tryptone et la caséine à raison de 0,25 % (poids/volume) pour chaque source.

Lors de cette cinétique, le milieu MSS est additionné d'une source de carbone ; la meilleure obtenue lors de la précédente cinétique.

### 1.2. Préparation de la suspension des spores de la souche EO6 du *Streptomyces* sp.

La souche EO<sub>6</sub> est d'abord ensemencée en stries serrées sur milieu HT (**Hickey et Tresner, 1952**) (la composition est donnée en annexe II) solide additionné de CoCl<sub>2</sub>. Après 5 jours d'incubation, de l'eau distillée stérile est versée dans la boîte. La surface du tapis mycélien est alors raclée avec une anse de platine et les spores sont récupérées dans 15 ml d'eau distillée stérile. La suspension obtenue est ajustée à une concentration de 10<sup>6</sup> cellules/ml sur la cellule de Malassez par comptage au microscope.

### 1.3. Pré-cultures

Pour chaque milieu de production, les pré-cultures sont préparées en prélevant 50 µl à partir de la suspension des spores et en l'inoculant dans un tube à essai contenant 5 ml de milieu de culture stérile (ISP2, Bennett, TSB, SSB ou MCB) soit 5 % de la culture de production. Après 2 jours d'incubation sur un agitateur rotatif (30°C, 250 rpm), cette pré-culture est utilisée pour ensemercer le même milieu de production.

### 1.4. Cultures de production

Pour les cinétiques de production, des flacons d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml (soit 20 % du volume de l'Erlenmeyer) de milieu liquide (complexe ISP2, Bennett, TSB, SSB ou MCB, ou encore le milieu MSS) sont ensemenés avec 5 ml (5 % du volume utile) de la pré-culture et mis en incubation sur un agitateur rotatif (250 rpm) à 30°C pendant 10 jours. Nous rappelons que chaque expérience est réalisée en double. Des prélèvements sont effectués en cours de fermentation, toutes les 24 h pour effectuer les différentes mesures.

## 1.5. Mesure de l'activité antibactérienne, de la croissance et du pH

### 1.5.1 Mesures de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne est mesurée par la méthode de diffusion des puits (**Parente et al., 1995 ; Ericsson and Sherris, 1971**) contre les bactéries-tests suivantes : *Staphylococcus aureus* (*Sa*), *Escherichia coli* (*Ec*), *Listeria monocytogenes* (*Lm*) et *Bacillus subtilis* (*Bs*). Pour cela, de la gélose nutritive semi-solide (12 g/l d'agar) préalablement ensemenée avec une bactérie indicatrice, est coulée en boîte de Pétri de manière à obtenir 4 mm d'épaisseur de milieu par boîte (soit 20 ml/boîte de 90 mm de diamètre). Après solidification du milieu à la température du laboratoire, des puits sont confectionnés à l'aide d'un emporte-pièce de 9 mm de diamètre.

Un échantillon de 1 ml de surnageant de culture est prélevée stérilement dans des tubes Eppendorf. Une aliquote de 0,1 ml est introduite dans chaque puits. Les boîtes sont mises 4 h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées pendant 24 h à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits, avec une règle graduée.

### 1.5.2. Mesure de la croissance et du pH

La croissance et le pH sont également mesurés durant toute la période de culture. Chaque jour une aliquote de 2 ml de la culture homogénéisée est prélevée stérilement dans un tube Eppendorf de 2 ml préalablement taré. Après centrifugation à 13000 rpm pendant 10 mn (**Bouras et al., 2006**), le surnageant est récupéré séparément pour mesurer le pH (au pH mètre HANNA instruments). L'eppendorf contenant le culot servira pour la mesure de la biomasse (par mesure du poids sec de la biomasse). Il est déposé dans un four à 105 °C pendant 24 h (**Bouras et al., 2006**). Le poids sec obtenu est rapporté en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture. Les pesées sont effectuées sur une balance analytique (KERN).

## 2. Extraction des antibiotiques

Après le choix du meilleur milieu de culture et détermination du jour de production optimale des antibiotiques, l'extraction des molécules actives est effectuée non seulement à partir du filtrat de culture mais aussi à partir du mycélium.

### 2.1. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant organique non miscible à l'eau. Trois solvants de différentes polarités sont testés ; le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol.

Le bouillon de culture (200 ml) est centrifugé à 12 000 rpm pendant 15 mn (**Bouras et al., 2006**), puis filtré. Un volume de 65 ml de filtrat est extrait deux fois avec un volume égal en solvant (2V/V) dans une ampoule à décanter. Les phases organiques et aqueuses sont récupérées séparément. La phase organique est déshydratée par passage à travers un papier-filtre whatman contenant du sulfate de sodium anhydre en poudre afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les deux phases organiques et aqueuses sont concentrées à sec au rotavapeur. Les deux extraits bruts, organique et aqueux, sont repris dans un minimum de solvant (méthanol ou eau distillée) et testés par antibiographie. Cette expérience nous permet de choisir le solvant à utiliser pour les futures extractions des antibiotiques.

### 2.2. Extraction à partir du mycélium

Le mycélium récupéré après centrifugation et filtration de la culture est lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation. Le culot mycélien est immergé avec du méthanol dans une fiole fermée. Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante. L'extrait méthanolique est ensuite obtenu par filtration à travers le papier Whatman puis concentré à sec au rotavapeur. Les activités antibactériennes sont recherchées par la méthode des disques de papier.

### **2.3. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits**

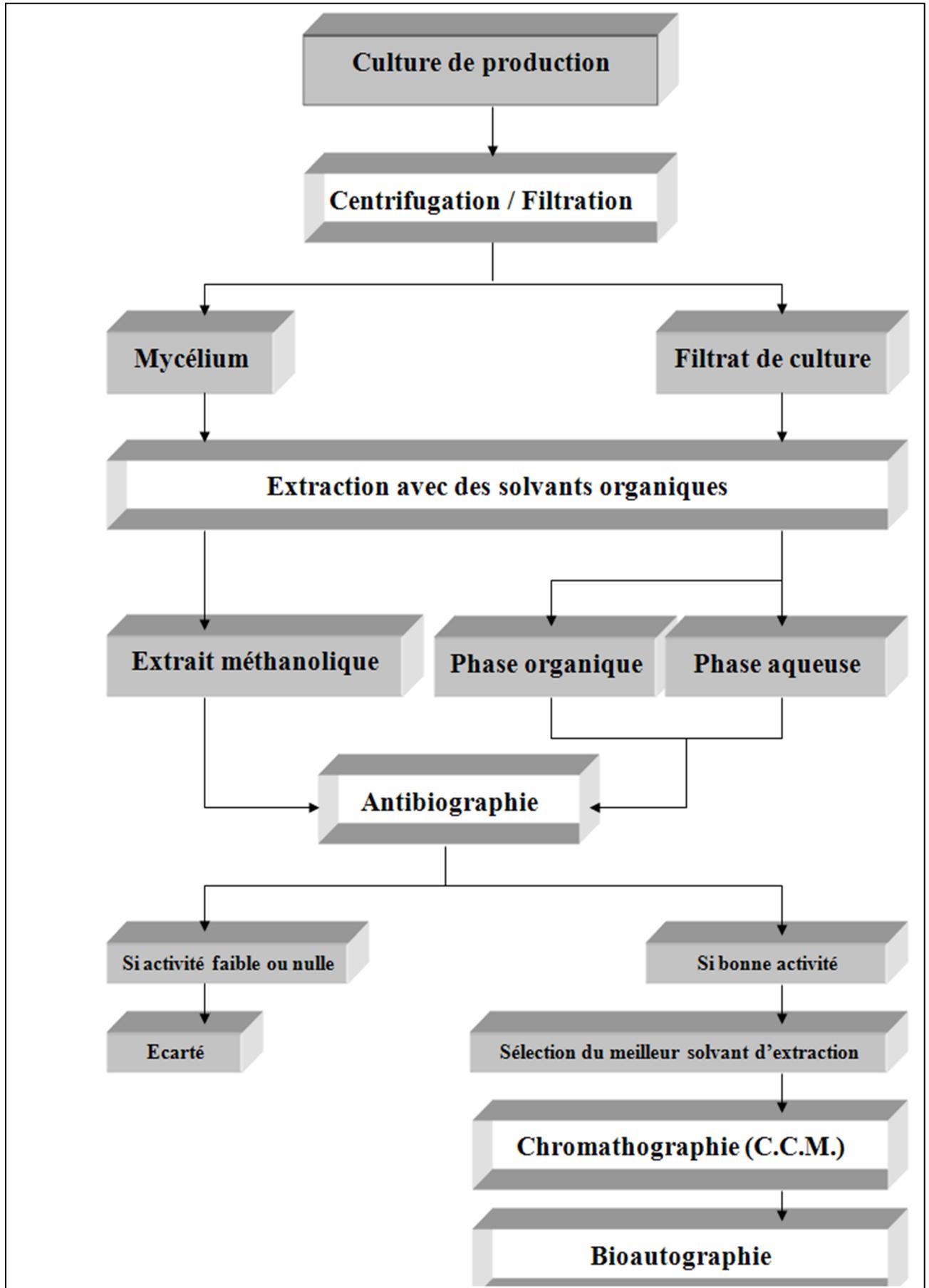
Les différents extraits organiques obtenus à partir du mycélium ou des filtrats, ainsi que les phases aqueuses, sont testés pour déterminer leurs activités antibactériennes. Pour cela, deux méthodes de diffusion sont utilisées : celle des puits, adaptée aux extraits aqueux et celle des disques de papier, adaptée aux extraits organiques.

#### **2.3.1. Méthode de diffusion des puits**

C'est la même méthode utilisée lors des cinétiques de production.

#### **2.3.2. Méthode de diffusion des disques de papier**

L'activité antimicrobienne des extraits de la phase organique a été évaluée à l'aide de la méthode de diffusion du disque (**Bauer *et al.*, 1966**). Les extraits à tester de la phase organique sont redissouts dans un minimum de méthanol, puis des disques de papier de 9 mm de diamètre sont imprégnés avec 60 µl de chaque extrait, et d'autres avec 60 µl du méthanol (comme témoin négatif). Des disques imprégnés de gentamycine (30 µg) sont utilisés comme témoin positif. Ils sont séchés pour faire évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 mn. Les disques imprégnés sont ensuite déposés stérilement à la surface du milieu G.N. semi-solide (12g/l d'agar), pré-ensemencé avec la bactérie-cible. Les boîtes de Pétri sont mises à 4°C pendant 4 h avant d'être incubées à 30°C pendant 24 h, la lecture des résultats se fait en mesurant les zones d'inhibition autour des disques.



**Figure 5** : Schéma général de production, d'extraction et de révélation des antibiotiques.

### 3. Révélation microbiologique

Afin de localiser les activités antibiotiques dans l'extrait brut, une bioautographie est réalisée selon la méthode de **Betina (1973)**. Pour cela, une chromatographie sur couche mince de gel de silice est nécessaire avant de révéler les taches actives.

#### 3.1. Préparation des plaques de gel de silice

Les plaques de gel de silice sont préparées avec 25 g de silice G60 (Merck) dans 60 ml d'eau distillée dans un flacon d'Erlenmeyer de 250 ml. Après une agitation magnétique pendant 10 mn, la pâte obtenue est étalée de manière uniforme sur des plaques en verre (20 x 20 cm) propres à l'aide de l'étaioir de DESAGA réglé pour une épaisseur de 0,25 mm. Les plaques sont ensuite séchées à température ambiante pendant une nuit et régénérées par chauffage au four à 105°C juste avant utilisation.

#### 3.2. Chromatographie sur plaques minces de gel de silice

À l'aide d'une microsiringue, les échantillons sont déposés au bas de la plaque CCM (20 cm × 20 cm) à 2 cm du bord sous forme de spots. Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le solvant de migration.

Les systèmes de solvants considérés sont souvent utilisés par les chercheurs pour l'étude des antibiotiques, il s'agit de :

- Acétate d'éthyle-méthanol (A.M.) : 100 : 15, en volumes.
- *n*-butanol-acide acétique-eau (B.A.E.) : 60 : 20 : 20, en volumes.

Après développement, les plaques sont retirées de la cuve et laissées sécher sous hotte toute la nuit, afin d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme-test lors de la bioautographie. Les chromatogrammes sont ensuite observés sous lumière ultra-violette pour localiser les taches présentant une absorption UV à 254 nm.

#### 3.3. Bioautographie

Dans une hotte microbiologique, les plaques développées et séchées sont placées sur un support dans une boîte en plastique (22 × 24 cm) désinfectée avec de l'alcool. Au fond de la boîte, une feuille imbibée d'environ 20 ml d'eau stérile permet de maintenir une atmosphère

humide et de retarder ainsi la dessiccation de la gélose au cours de l'incubation. Le dispositif est alors stérilisé durant 1 h sous UV à 254 nm.

Entre temps, 80 ml de gélose nutritive molle (9 g/l d'agar) en surfusion (45 à 50°C) est inoculée avec 200 µl d'une suspension de la bactérie-cible *Bacillus subtilis* (Bs). Après homogénéisation, ce milieu est uniformément réparti sur la plaque à l'aide d'une seringue stérile. Après solidification de la gélose, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h pour permettre la diffusion de l'activité antibiotique dans le milieu puis incubées à 30°C. Le microorganisme-test va pousser sur toute la plaque sauf au niveau des taches présentant une activité antibiotique (auréole claire d'inhibition). Les zones d'inhibition sont mesurées après 24h et les Rf calculés.

$$Rf = \frac{\text{distance entre dépôt et tâche active}}{\text{distance entre dépôt et front du solvant}}$$

Le présent travail a montré l'influence des milieux de culture sur la production d'antibiotiques par la souche EO6 de *Streptomyces* sp. isolée à partir d'un sol saharien, au niveau du laboratoire LBSM de l'E.N.S. de Kouba (Alger), lors d'un programme de criblage de souches d'actinomycètes productrices d'activités antimicrobiennes.

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence des milieux de culture sur la production d'antibiotiques par la souche EO6. Notre objectif est de rechercher un milieu de culture favorable à la production d'antibiotiques. Pour cela, trois parties ont été développées :

Dans la première partie, nous avons étudié la cinétique de production et de croissance dans 5 milieux complexes préconisés dans la littérature pour la production des antibiotiques par les actinomycètes. Le milieu complexe Bennett ayant permis d'atteindre, dans des conditions expérimentales identiques, une production d'antibiotiques jugée satisfaisante pour la suite du travail, a été retenu.

Dans la deuxième partie, nous avons testé cinq sources de carbone dans le milieu semi-synthétique (MSS), l'amidon a permis de donner un rendement meilleur qu'avec le glucose, le glycérol, le fructose, et le saccharose.

Et dans la troisième partie, nous avons étudié l'effet de cinq sources d'azote sur la production des antibiotiques dans le milieu MSS. La meilleure source d'azote s'avère être le sulfate d'ammonium.

Ainsi, les résultats de notre étude nous ont permis de retenir le milieu Bennett et le milieu synthétique à base d'amidon et de sulfate d'ammonium comme milieux de production des activités antibactériennes pour la souche EO6 de *Streptomyces* sp.

Ce travail qui ne représente qu'une étude préliminaire sur la production des antibiotiques par la souche EO6 de *Streptomyces* sp. a permis de définir quelques pistes de recherche ultérieures :

- Essais d'optimisation du milieu « MSS – amidon - sulfate d'ammonium » en testant différentes concentrations de chaque source.
- Tester d'autres sources nutritionnelles, de carbone, d'azote, d'oligoéléments, du phosphate, du potassium et des acides gras saturés et non saturés.
- Une fois les meilleures sources définies, différentes concentrations du même composé sont testées.
- Etudier l'effet du pH, de la température et de l'aération.

Le but est d'établir un milieu de culture dans lequel, des cultures seront réalisées en fermenteur pour un rendement de production optimale des antibiotiques.

- Aharonowitz Y. (1980). - Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.* 34, 209-233.
- Aharonowitz Y., Demain A.L. (1978). - Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy.* 14: 159-164.
- Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. and Beaulieu C. (2002). - Characterization of rhizospheric soil streptomycetes from moroccan habitats and their antimicrobial activities. *World J. of Microbiol. & Biotechnol.*, 18, 49-54.
- Bauer A.W., Kirby W.M.M., Sherris J.C. and Turk M. (1966). - Antibiotic susceptibility testing by a standardized disc method. *Am. J. Clin. Pathol.*, 45, 493-496.
- Becking J.H. (1974). - Family III. *Frankiaceae*. In: Bergey Manual of Determinative Bacteriology. 8<sup>th</sup> Eds. Buchanan R.F. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.
- Benslimane C. (1996). - Etude physiologique de *Streptomyces ambofaciens* producteur de la spiramycine en milieu complexe. Effet de la source de carbone sur la consommation des acides aminés et des acylglycérols. Thèse Doctorat, INPL-ENSAIA. Nancy, France, pp 199.
- Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987). - CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. Part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC press, Boca Raton.
- Berdy J., (2005). - « Bioactive microbial metabolites: a personalview », *Journal of antibiotics*, vol. 58, no. 1, app. 1-26.
- Bérdy J. (2005). - Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiototechnol. (Tokyo)*., 58, 1-26.
- Betina V. (1973). - Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. Chromatogr.*, **78**, 41-51.
- Block S.S. (1983). - Perspectives for industrial products. In: Desinfection, sterilization and preservation. Block S.S. (Ed.). 3rd Ed. Lea and Febiger. Philadelphia, pp. 608-655.
- Boudjella H. (1994). - Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. Alger. 177 p.
- Bouras N. (2005). – Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137, PhD Thesis, Institut National Polytechnique de Toulouse, France.
- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2005). - Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.*, **100**, 390–397.

- Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006). - Nutritional requirements for the production of dithiolopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 Enzyme and Microbial Technology, **39**, 1423–1429.
- Bouras N., Merrouche R., Lamari L., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2008). – Precursor-directed biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry.*, 43, 1244-1252.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J. and Vobi G. (1989). - Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In: Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J.P. et Sanglier J.J. (Eds.). Masson. Paris, pp. 33-70.
- Bu'lock J. D. (1965). - The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism. Mc Graw-Hill, New-York.
- CA-SFM. (2010). Communiqué du Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie, [http : //www.sfm.asso.fr/](http://www.sfm.asso.fr/).
- Cross T. (1981). - Aquatic actinomycetes: a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 397-423.
- Demain A.L., Kennel Y.M., Aharonowitz Y. (1979). – Carbon catabolite regulation of secondary metabolism. pp. 163-185. In: “Microbial technology; current state, future prospects, 29<sup>th</sup> Symp. Soc. Gen. Microbiol. Cambridge University Pressm Cambridge.
- Demain A.L. (1982). - Catabolite regulation in industrial microbiology. In : *Overproduction of microbial products*. (Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z., Eds), pp. 3-19. Academic Press : London.
- Demain A.L., Dykhuizen L. (2006). - Ecology and industrial microbiology. Editorial Overview. *Current Opinion in Microbiology* .9: 237-239.
- Dommergues Y., Manganot F. (1970). - Ecologie microbienne du sol, Masson et Cie. France.
- Donadio S., Monciardini P., Alduina R., Mazza P., Chiocchini C., Cavaletti L., Sosio M. and Puglia A.M. (2002). - Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. *Journal of Biotechnology.*, 99, 187-198.
- Dumenil D. et Sanglier J. J. (1989). - Physiologie de la production des antibiotiques dans «Biotechnologie des antibiotiques».Masson (Ed). 195-217 pp.
- Ericsson J.M. and Sherris J.C. (1971). - Antibiotic sensitivity testing: report of an international collaborative study. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 217 (Suppl): 1-90.
- Flårdh K. and Buttner M. J. (2009). - *Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews Microbiology.*, **7**, 36-49.

- Friedman, C.R. & Whitney, C.G. (2008). – It's time for a change in practice: reducing antibiotic use can alter antibiotic resistance. *J. Infect Dis.* 197, 1082-1083.
- Goodfellow M. and Williams S.T. (1983). - Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 189-216.
- Goodfellow M., Ferguson E.V. and Sanglier J.J.. (1992). – Numerical classification and identification of *Streptomyces* species – a review. *Gene* 115 : 255-233.
- Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B.N. (2002). - Antifungal antibiotics. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 58, 46-57.
- Hacène H. (1992). - Sélection de souches d'*Actinomycetales* « rare » productrices d'activités antifongiques de nature non polyénique. Purification et caractérisation des principaux antibiotiques synthétisés. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, U.S.T.H.B, Alger. p 281.
- Haslay C., Leclerc H. (1993). - Microbiologie des eaux d'alimentation. Lavoisier TEC & DOC. France.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1987). - Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.* , 65, 501-509.
- Hickey R.I. and Tresner H.D. (1952). - A cobalt-containing medium for sporulation of *Streptomyces* species. *J. Bacteriol.*, 64, 891-892.
- Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C. P., Ward J.M. and Schrempf H. (1985). - Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation.
- Hopwood, D.A. (2007). - *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. Oxford University Press.
- Kim B.S., Lee J.Y., and Hwang B.K. (1998). - Diversity of actinomycetes antagonistic to plant pathogenic fungi in cave and sea-mud soils of Korea. *J. Microbiol.*, 36, 86–92.
- Kitouni M., Boudemagh A., Oulmi., Reghioua S., Boughachiche F., Zerizer H. Hamdiken H., Couble A., Mouniee D., Boulahrouf A. and Boiron P., (2005). – Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of north-east of Algeria. *J. Myc. Méd.* 15; 45-51.
- Lacey (1973). – Actinomycetes in soils, composts and fodders. *Soc. Appl. Bacteriol. Symp. Ser.*, 2, 231-251.
- Larparent-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1992).- Biotechnologies. Principes et méthodes. Doin editeurs, Paris.
- Larparent J.P. et Sanglier J.J. (1989). - Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris, p. 481.

- Larpent J. P., Larpent-Gourgaud M. 1990. Mémento Technique de Microbiologie. TEC & Doc- Lavoisier. France.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2000). - Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 78, 399-405.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. & Germain, P. (1988) - Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 44-51.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1967). - Biology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.*, 21, 71-100.
- Lechevalier M.P. (1981). - Ecological associations involving actinomycetes. *In: Actinomycetes*. Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.*, 11, 159-166.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. & Germain, P. (1995) - Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, 31, 304-311.
- Mariat F., Sebald M.(1990). - Actinomycétales. *In. : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Médecine-Sciences. Inflammation. France. Deuxième partie : 933-999.*
- Martin J.F. and Demain A.L. (1980). - Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, 44, 230-261.
- McCarthy A.J. and Cross T. (1981). - A note on a selective isolation medium for the thermophilic actinomycete *Thermomonospora chromogena*. *J. Appl. Microbiol.*, 51, 299-302.
- Mellouli L., Ben Ameer-Mehdi R., Sioud S., Salem M. and Bejar S. (2003) - Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a new isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology* 154: 345-352.
- Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S. and Bogatzevska N. (2002). - Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. *Journal of Culture Collections.*, 3, 3-14.
- Moreira K.A., Albuquerque B.F., Teixeira M.F.S., Porto A.L.F., Lima F.J.L. (2002). - Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *J. Microbiol. Biotechnol.*, 18 (4), 307-312.
- Naidenova M. and Vladimirova D. (2002). - Isolation and taxonomic investigation of actinomycetes from specific biotopes in bulgaria. *Journal of Culture Collections.*, 3, 15-24.
- Nanjwad B., Chandrashehara S., Goudanavar P. S., Shamarez A. M., Manvi F. (2010). - Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 9: 373-377.
- Neu, H.C. (1992) - The crisis in antibiotic resistance. *Science*, 257, 1064-1073.

- Okanishi M. and Hotta K. (1980). - Regulation of antibiotics production in microorganisms. In: *Molecular breeding and genetics of applied microorganisms*, (Sakagushi K. and Okanishi M., Eds.), pp. 9-28. Academic Press : New York.
- Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H *et al.*, (2006). - Herbimycine, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The journal of Antibiotics*.32: 255-261.
- Parente E.C., Brienza C., Moles M. and Ricciardi A. (1995). - A Comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Meth.*, 22, 95-108.
- Piret J.M. and Demain A.L. (1988). Actinomycetes in biotechnology : an overview. In : *Actinomycetes in Biotechnology*. (Goodfellow M., Williams S.T. and Mordarski M., Eds.), pp. 416-482. Academic Press : London.
- Rapilly F. (1968). – Techniques de mycologie en pathologie végétale. *Ann. Epiphyties*, 19, numéro hors série.
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992). - Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol.*, 38, 1066-1073.
- Sabaou N., Amir H. et Bounaga N. (1980). - Le palmier dattier et la fusariose. X. Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère : leur antagonisme vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Ann. Phytopathol.*, 12, 253-257.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. and Bennadji H. (1998). - les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Secheresse.*, 9 (2), 147-153.
- Saffroy S. (2006). - Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France. 150 p.
- Shapiro S. et Vining L.C. (1983). - Nitrogen metabolism and chloramphenicol production in *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.* 29, 1706-1714.
- Shirling E.B. and Gottlieb D. (1966). -Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16, 3313-3340.
- Smaoui S. (2010). - Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p.
- Smirnov A., Esnault C., Nowacka-Mazurek A., Martel C., Darbon-Rongere E., Chouayekh H., Ghorbel S., Shikura N., Seghezzi N. and Virolle M.J. (2008). - Toward a better understanding of why and how antibiotic biosynthesis is being triggered in *Streptomyces*. In: Proceedings of the 1st industrial biotechnology international conference, Naples, Italie.

Strub C. (2008). - Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine Chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, 221p.

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

Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. and de Champs C. (2006). - First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of Enterobacteriaceae in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents.*, 27, 397-402.

Umezawa H., Okami Y., Hashimoto T., Suhara Y., Hamada M., and Takeuchi T. (1965). -A new antibiotic, kasugamycin. *J. Antibiot.*, 18, 101–103.

Waksman S.A. (1945). - Microbiological antagonism and antibiotic substances. The Commonwealth Fund, New York.

Warren H.B., Prokop J.F. and Grundy W.E. (1955). - Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antib. Chemother.*, 5, 6-12.

Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D. (2001). - How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? *Arch. Microbiol.*, 176, 386-390.

Williston E.H., Zia-Walrath P., Youmans G.P. (1947). - Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against Virulent human type Tubercle Bacilli. *J. Bacteriol.*, 54, 563-568.

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

**ANNEXE I****Matériel du laboratoire utilisé****Appareils**

- Agitateur magnétique chauffant (TÜV Bayern Geprüfte Sicherheit).
- Autoclave (pbi).
- Balance analytique (KERN ABJ).
- Congélateur -32° C (LIEBHERR comfort).
- Etuve (memmert).
- Evaporateur rotatif (BÜCHI 461).
- Four Pasteur (memmert).
- Micro-onde (Easytronic).
- pH mètre (HANNA instruments).
- Réfrigérateur 4° C (IGNIS).
- Séchoir (MégaTurbo).
- Vortex (OSI).
- Centrifugeuse des eppendorfs (P SELECTA).
- Centrifugeuse (Jouan E96) avec réfrigération.
- Hotte microbiologique à UV (FLUFRANCE).
- Hotte chimique (PBL mobili).
- Cellule de Malassez.
- Etaloir de gel de silice pour préparation des plaques CCM (DESAGA).
- Microscope optique (Motic).

**Produits chimiques**

- HCl, 0.1N (SIGMA-ALDRICH).
- NaOH, 0.1N (SIGMA-ALDRICH).
- Sulfate de Sodium anhydre en poudre (SIGMA-ALDRICH).

- Dichlorométhane (SIGMA-ALDRICH).
- Acétate d'éthyle (SIGMA-ALDRICH).
- Méthanol(SIGMA-ALDRICH).
- n-butanol(SIGMA-ALDRICH).

**Petits matériel et consommables**

- Anse en platine.
- Bec Bünsen.
- Boîtes Petri en plastique 90 mm.
- Emporte pièce de 9 mm de diamètre.
- Eppendorfs 1,5 ml et 2 ml.
- Eprouvettes graduées 100 ml et 500 ml.
- Pipettes Pasteur.
- Erlenmeyers 250 ml et 500 ml.
- Seringue.
- Flacons 250 ml.
- Micropipettes réglables.
- Embouts 200 ml et 1000 ml.
- Microseringues 25 µl et 500 µl.
- Papier filtre Whatman n°42.
- Règle graduée.
- Piluliers 25 ml.
- Tubes à essai 20 ml.
- Godets de centrifugeuse 110 ml.
- Tubes à hémolyse.
- Ampoules à décanter 500 ml avec des supports adéquats.
- Entonnoirs en verre.
- Pincés.

-Papier aluminium.

-Papier Jausef.

-Couton.

-Disques en papier d'un diamètre de 9 mm.

-Plaques en verre (20X20 cm) pour chromatographie sur couche mince.

-Cuve de chromatographie.

## ANNEXE II

### La composition des milieux

#### - HT (Hickey et Tresner, 1952)

extrait de levure : 1 g ; extrait de viande : 1 g ; dextrines blanche : 10 g ; peptone (biotrypticase) : 2 g ;  $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  : 20mg (10 mL) ; agar : 18 g/L ; eau distillée : q.s.p. 1000 mL. pH 7,3.

#### - Gélose nutritive semi-solide

peptone : 5 g ; extrait de viande : 1 g ; extrait de levure : 2 g ; NaCl : 5 g ; agar : 12 g ; eau distillée : q.s.p. 1000 mL. pH 7,4.

## ANNEXE III

**Tableau 1:** Résultats de l'antibiogramme par la méthode de diffusion en milieu gélosé.

	Antibiotiques*													
	AMX		TIC		CZ		GM		AN		TM		C	
	S ≥29	R ≤28	S ≥24	R <22	S ≥18	R ≤14	S ≥20	R <20	S ≥20	R <20	S ≥20	R <20	S ≥23	R <23
<b>Sa</b>	10 R		46 S		43 S		30 S		30 S		30 S		36 S	

	AMX		TIC		CZ		GM		AN		TM		C	
	S ≥23	R <16R	S ≥24	R <22	S ≥18	R <12	S ≥18	R <16	S ≥17	R <15	S ≥18	R <16	S ≥23	R <19
	<b>Bs</b>	16 I		36 S		50 S		30 S		30 S		30 S		36 S
<b>Lm</b>	0 R		30 S		13 S		24 S		30 S		15 R		25 S	

	AMX		TIC		CZ		GM		AN		TM		C	
	S ≥21	R <16R	S ≥24	R <22	S ≥19	R ≥23	S ≥18	R <16	S ≥17	R <15	S ≥18	R <16	S ≥23	R <23
	<b>Ec</b>	0 R		15 R		0 R		0 R		13 R		11,5 R		16 R

\* : Diamètres critiques en mm, déterminés selon le CA-SFM (2010). R : Résistant, S : Sensible.

I : Intermédiaire.

**AMX** : Amoxicilline, **TIC** : Ticarcilline, **CZ** : Céfazoline, **GM** : Gentamicine, **AN** : Amikacine, **TM** : Tobramycine, **C** : Chloramphénicol.

Sa : *Staphylococcus aureus*, Bs : *Bacillus subtilis*, Lm : *Listeria monocytogenes*, Ec : *Escherichia coli*.

## Résumé

La souche EO6 *Streptomyces* sp., est productrice d'antibiotiques à propriétés antibactériennes. Lors de ce projet d'étude, l'influence de quelques milieux de culture sur la production d'antibiotiques est étudiée. Le but est de choisir un milieu de culture permettant une production optimale des antibiotiques.

La souche a d'abord fait l'objet d'une étude de ses propriétés antagonistes contre des bactéries (à Gram négatif et à Gram positif) indicatrices.

Pour l'étude de l'effet des milieux de culture sur la production d'antibiotiques, des cinétiques de production et de croissance ont été menées. Tout d'abord, cinq milieux de culture complexes représentés par le Bennett, l'ISP2, le MCB, le TSB, et le SSB sont testés. Les résultats de cette première cinétique indiquent que le milieu complexe Bennett est meilleur.

Dans une autre cinétique, un milieu de base semi-synthétique (MSS) est utilisé pour étudier l'influence de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques. La comparaison des résultats obtenus a permis de retenir l'amidon et le sulfate d'ammonium comme sources de carbone et d'azote respectivement.

Les activités antimicrobiennes produites sont extraites par différents solvants organiques à partir du filtrat de culture et du mycélium. Les résultats d'antibiographie ont montré que l'activité antibactérienne est concentrée principalement dans les phases aqueuses, et que l'extrait le plus actif est celui au *n*-butanol pour le milieu ISP2 et celui à l'acétate d'éthyle pour les milieux Bennett et MSS.

Les activités antibactériennes sont ensuite révélées par bioautographie (révélation microbiologique) avec deux systèmes de solvant. Les taches actives détectées sont mieux séparées des autres composés inactifs de l'extrait brut dans le système de solvant « acétate d'éthyle-méthanol ».

Les résultats obtenus sont intéressants et encouragent la poursuite du travail sur la production, la purification et la caractérisation des activités antibactériennes.

**Mots clés :** *Streptomyces*, antibiotiques antibactériens, milieux de culture, cinétiques de production.

## Abstract

The strain EO6 *Streptomyces* sp. produces antibiotics with antibacterial properties. During this project, the effect of some culture media on the production of antibiotics was studied. The purpose is to choose a culture medium for optimal production of antibiotics.

The strain was first screened for its antagonistic properties, using target bacteria (Gram negative and Gram-positive).

For the study of the effect of culture media on the production of antibacterial activities, kinetics of production and growth were conducted. Five complex culture media represented by Bennett, ISP2, MCB, TSB, and SSB were first tested. The results indicated that the production of antibiotics was better in Bennett medium.

In the second and the third kinetics, the basal semi-synthetic medium (MSS) was used to study the effect of some carbon and nitrogen sources on the production of antibiotics. The results indicated that starch and ammonium sulphate were the optimal carbon and nitrogen sources respectively.

The produced antibacterial activities were extracted with different organic solvents from the culture filtrate and mycelium. The results showed that the antibacterial activity was mainly concentrated in the aqueous phases, and that the most active extract was obtained with *n*-butanol for the ISP2 medium, and with ethyl acetate for Bennett and MSS media.

These activities were then located by bioautography (microbiological revelation) using two solvent systems. The detected active spots were better separated from the non active compounds of the crude extract in the ethyl acetate-methanol solvent system.

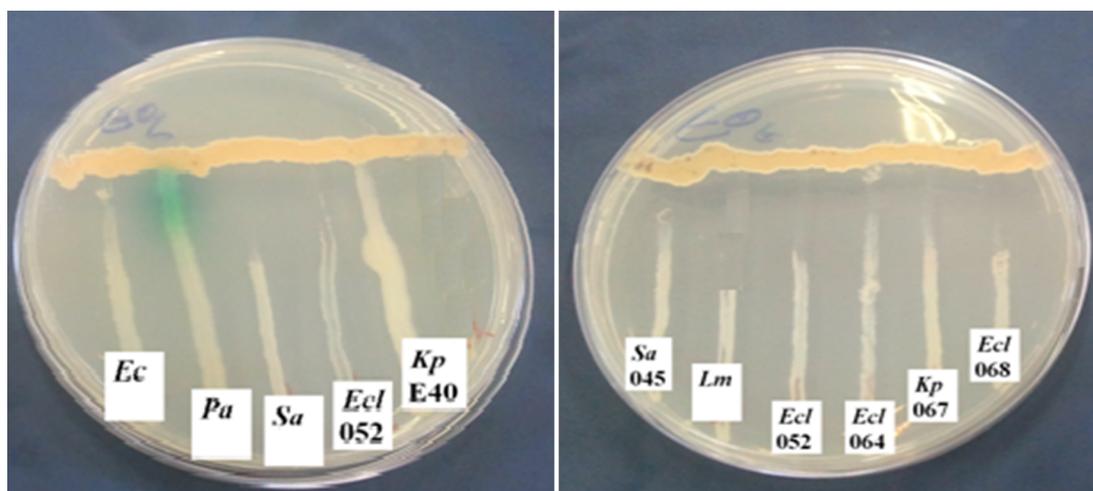
These obtained results are interesting and encourage the pursuit of studies on the production, purification and characterization of the antibacterial activities.

**Keywords** : *Streptomyces*, antibacterial antibiotics, culture media, kinetics of production.

Au cours de cette étude sur la production d'antibiotiques par la souche EO6 de *Streptomyces* sp., nous avons commencé par déterminer son spectre d'activité antibactérienne contre des bactéries indicatrices. Dans une deuxième partie, nous avons d'abord testé des milieux complexes pour étudier la production des antibiotiques. Puis, nous avons étudié l'effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production et ce, sur un milieu de base semi-synthétique.

## I. DETERMINATION DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE PAR LA TECHNIQUE DES STRIES CROISEES

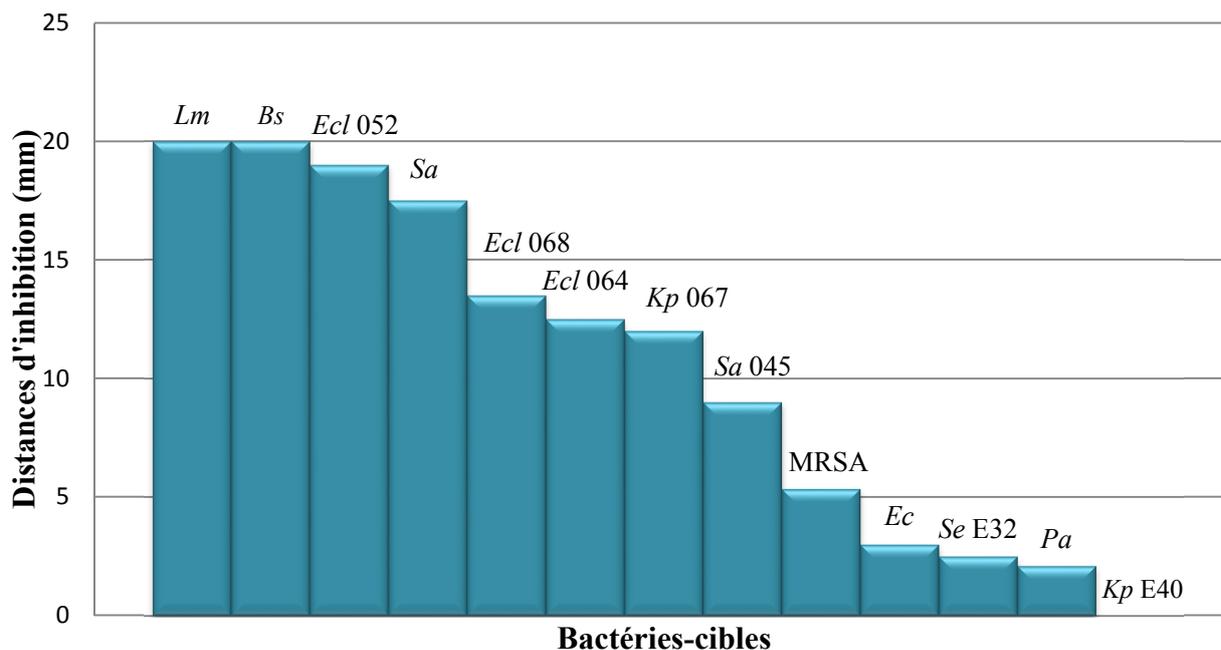
L'activité antibactérienne de la souche EO6 a d'abord été recherchée par la méthode des stries croisées (figure 6) sur le milieu de culture ISP2.



**Figure 6** : Recherche des propriétés antibactériennes de la souche EO6 de *Streptomyces* sp. par la méthode des stries croisées.

### 1. Résultats

L'activité antibactérienne de la souche a touché toutes les bactéries testées (figure 7) à l'exception de la souche *kp* E40 de *Klebsiella pneumoniae* contre laquelle l'activité est nulle. L'activité est très forte contre *Bacillus subtilis* (*Bs*) et *Listeria monocytogenes* (*Lm*), forte contre *Enterobacter cloacae* (*Ecl* 052) et *Staphylococcus aureus* (*Sa*), moyenne contre *Enterobacter cloacae* (*Ecl* 068), (*Ecl* 064), *Klebsiella pneumoniae* (*Kp* 068) et *Staphylococcus aureus* (*Sa* 045), faible contre MRSA, très faible contre *Escherichia coli* (*Ec*), *Salmonella enterica* (*Se* E32) et *Pseudomonas aeruginosa* (*Pa*).



**Figure 7 :** Spectre d'activité antimicrobienne de la souche EO6 *Streptomyces sp.*

## 2. Discussion

La méthode des stries croisées est une technique de criblage précoce, largement utilisée dans les programmes de recherche de nouvelles molécules antibiotiques. Simple et pratique, elle consiste à rechercher les propriétés antibiotiques des actinomycètes cultivés sur milieu solide (Williston *et al.*, 1947) et ainsi déterminer leur spectre d'activité contre un nombre de cibles microbiennes (bactéries, champignons et levures). Le milieu de culture doit avoir la propriété de permettre une bonne croissance de la souche d'actinomycète et également celle des souches-cibles. Les résultats obtenus sont qualitatifs et permettent d'orienter la suite du travail lors du passage à la production en milieu liquide (Larpent et Sanglier, 1989).

Dans le criblage préliminaire réalisé par Khebizi (2010) pour de nombreuses souches d'actinomycètes dont la souche EO6, des germes englobant des bactéries et des champignons ont été ciblés. Pour la souche EO6, l'activité antibactérienne était très importante (jusqu'à 40 mm de distance d'inhibition). Celle contre les champignons était faible.

## II. ETUDE DE LA PRODUCTION D'ANTIBIOTIQUES EN MILIEUX DE CULTURE AGITES

Trois cinétiques de production d'antibiotiques sont réalisées en milieux de culture agités. La première a été réalisée sur cinq milieux de culture complexes (ISP2, Bennet, TSB, SSB, et MCB) habituellement utilisés par les chercheurs comme milieux de production. Dans la deuxième cinétique, l'effet de cinq sources de carbone (amidon, fructose, glucose, glycérol et saccharose) est étudié sur un milieu semi-synthétique (MSS) de base. La troisième cinétique

est effectuée sur le même milieu de culture (MSS) où cinq sources d'azote (sulfate d'ammonium, asparagine, leucine, tryptone et caséine) sont testées.

Il est à signaler que les trois cinétiques sont réalisées dans des conditions identiques, à savoir la taille et l'âge de l'inoculum, les conditions de culture (volume du milieu, agitation...) et les analyses. Le but de ce travail est de comparer entre les milieux, complexe et semi-synthétique, pour retenir un milieu de production pour la souche EO6.

Nous rappelons que les cultures de production sont réalisées en fioles d'Erlenmeyer agitées. La production d'antibiotiques est évaluée par la méthode de diffusion des puits contre quatre bactéries-cibles ; *Bacillus subtilis* (*Bs*), *Listeria monocytogenes* (*Lm*), *Staphylococcus aureus* (*Sa*) et *Escherichia coli* (*Ec*). Dans ces cinétiques, sont également mesurés la croissance (par mesure du poids sec de la biomasse) et le pH. Pour chaque cinétique, les résultats sont présentés de deux manières ; une présentation selon le milieu de culture, et une autre présentation par bactérie-cible.

## 1. Cinétique de production en milieux complexes

### 1.1. Résultats

Les résultats de l'activité antibiotique, de la biomasse et du pH dans les milieux complexes sont illustrés par les figures 8 et 9. Dans la figure 8, les résultats sont présentés par milieu de culture. Dans la figure 9, ils sont présentés par bactérie-cible. Ces résultats montrent que :

- L'activité antibactérienne est décelée dès le 1<sup>er</sup> jour de fermentation contre *Bs* et *Lm* et ce, dans les cinq milieux.
- Des cinq milieux testés, le milieu Bennett s'est révélé meilleur. Il est suivi par l'ISP2, puis le SSB, le TSB et enfin le MCB.
- Dans le milieu Bennett, l'activité apparaît dès le 1<sup>er</sup> jour et atteint son maximum le 5<sup>ème</sup> jour de fermentation et ce, pour toutes les bactéries-tests. Cette activité évolue en corrélation avec la croissance. Le pH évolue lentement et atteint son maximum (pH 8,7) le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.
- L'activité apparaît dans le milieu ISP2 dès le 1<sup>er</sup> jour sauf sur *Sa* où elle apparaît le 2<sup>ème</sup> jour et atteint son maximum le 9<sup>ème</sup> et/ou le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation. Cette activité antibiotique évolue en corrélation avec la croissance. Le pH initialement de 7,3 tend à diminuer en début de fermentation puis augmente progressivement et légèrement et atteint son maximum (pH 8,46) le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.
- Avec le milieu SSB l'activité apparaît dès le 1<sup>er</sup> jour mais moins forte que dans le Bennett et l'ISP2. Elle n'est importante au 1<sup>er</sup> jour que contre *Lm* (15 mm) et reste appréciable (10-12 mm) entre le 5<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour sur les quatre bactéries-cibles. Cette activité évolue en corrélation avec la croissance du mycélium. Le pH de départ (7,3) diminue progressivement et légèrement durant la fermentation et atteint son minimum (pH 4,5) le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.

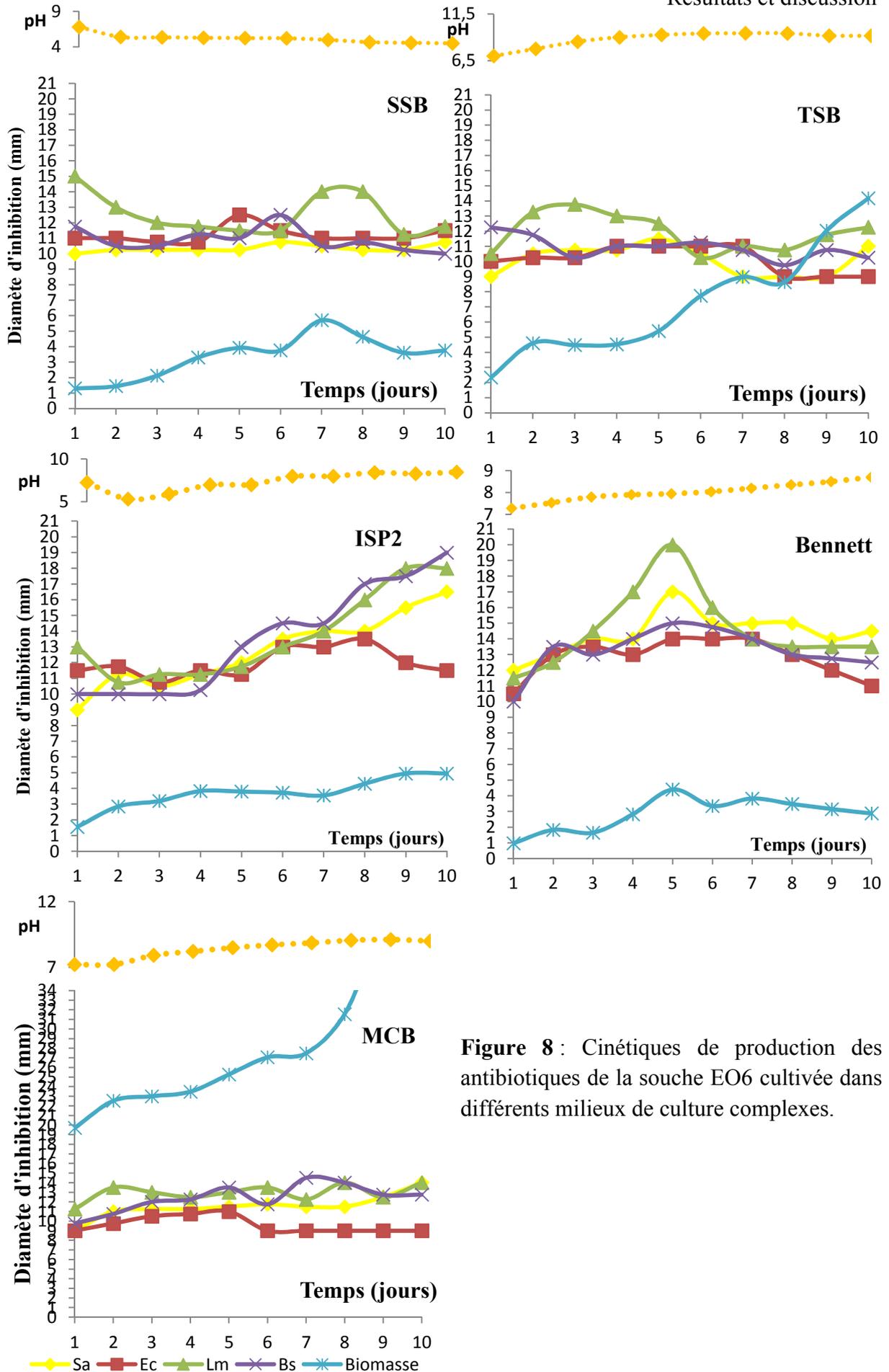
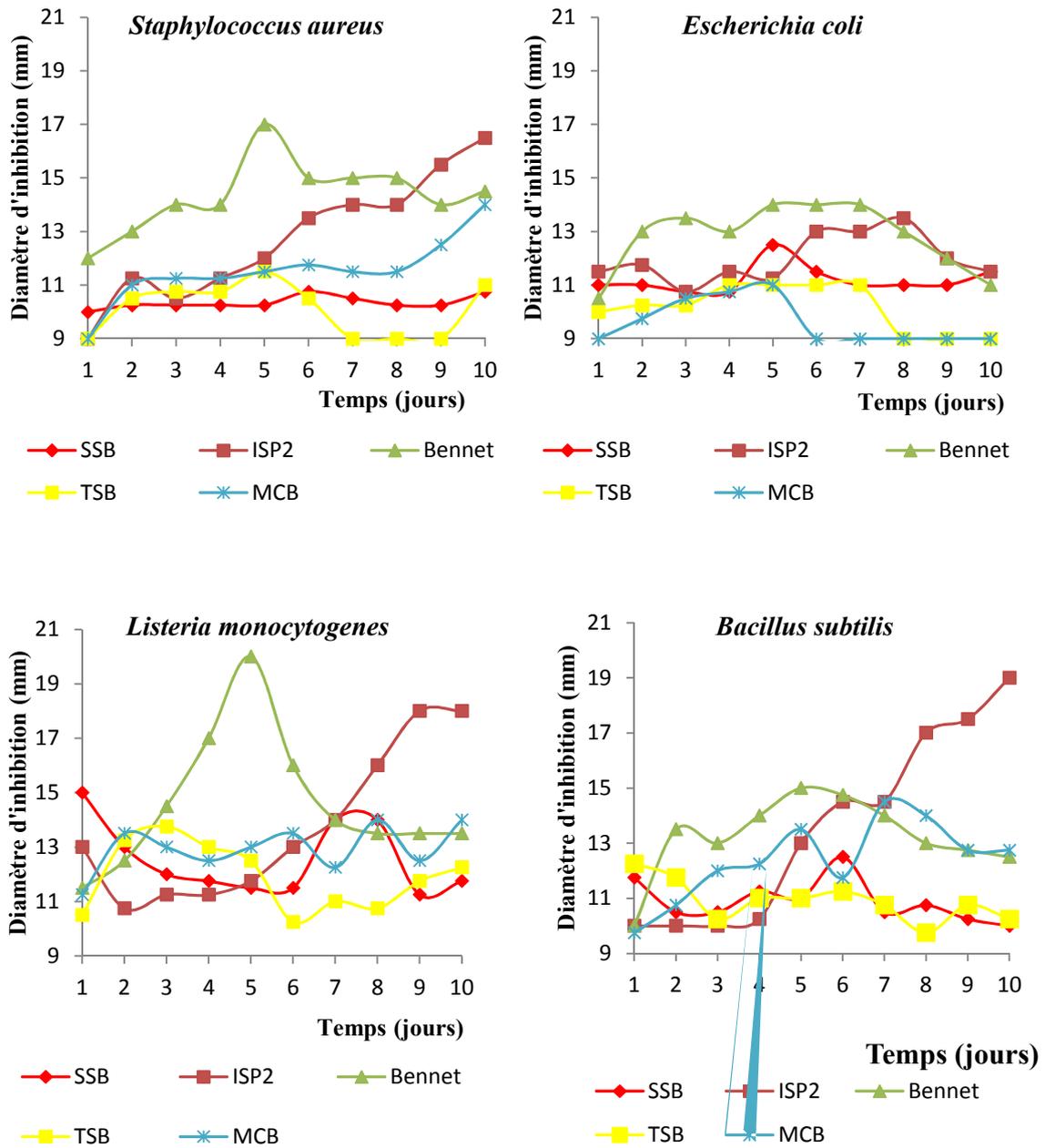


Figure 8 : Cinétiques de production des antibiotiques de la souche EO6 cultivée dans différents milieux de culture complexes.



**Figure 9** : Activité antibactérienne de la souche EO6 en milieux complexes SSB, ISP2, Bennett, TSB et MCB.

- La souche EO6 sur TSB donne une activité du 1<sup>er</sup> au 5<sup>ème</sup> jour de fermentation et diminue entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup>. Cette activité décroît contrairement à la croissance qui augmente. Le pH passe progressivement de 7,3 à 9,1 le 10<sup>ème</sup> jour.
- Dans le milieu MCB, comparé aux autres milieux testés, l'activité obtenue est la plus faible. Elle augmente très légèrement les cinq derniers jours de la fermentation sauf contre *Ec* où l'on note 9 mm. Cependant, la croissance a évolué de manière importante et très remarquable, elle est passée de 19,7 g/L le 1<sup>er</sup> jour à 42,85 g/L le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.

### 1.1. Discussion

Les cinétiques de production ont été suivies dans les cinq milieux de culture ISP2, Bennett, TSB, SSB et MCB. La comparaison des résultats de production dans ces milieux de culture montre que le milieu Bennett est le meilleur milieu de production d'antibiotiques et ce, contre les quatre bactéries testées. Le même résultat est obtenu par de nombreux auteurs (**Belghit, 2010 ; Kitouni *et al.*, 2005 ; Barakat *et al.*, 2002**). Il est suivi du milieu ISP2.

Le choix du meilleur milieu de production dépend à la fois des diamètres des zones d'inhibition obtenus avec le milieu, du jour de production optimale, et du nombre des germes-tests touchés par l'activité antibiotique.

Le contraire est observé avec le milieu MCB où l'on note une croissance importante au dépend de la production d'antibiotiques. Ce milieu contient des dextrans et de l'extrait de levure qui stimulent la croissance et entraînent une augmentation significative de la biomasse. Des études sur la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens* ont montré que la diminution de 50 % de la concentration de ces deux composés, permet d'améliorer la production de spiramycine (**Benslimane, 1996**).

Le fait qu'un taux de croissance élevé soit souvent corrélé à une faible production de métabolites secondaires laisse à penser qu'un faible taux de croissance pourrait initier le métabolisme secondaire. Cependant, dans la plupart des cas, il est difficile de savoir ce qui détermine l'initiation du métabolisme secondaire à savoir le taux de croissance faible ou bien la limitation nutritionnelle qui y est la plupart du temps associée. Par ailleurs, dans quelques cas, comme la synthèse d'érythromycine par *Streptomyces erythraeus* (**Trilly *et al.*, 1987**) ou de la chlortétracycline par *S. aureofaciens* (**Sikyta *et al.*, 1961**), la production d'antibiotique augmente avec le taux de croissance.

A ce stade des résultats, nous pouvons donc proposer le milieu Bennett comme milieu de production pour la souche EO6, avec arrêt de la culture le 5<sup>ème</sup> jour (jour de production optimale) afin de réaliser des extractions et continuer l'étude des antibiotiques produits.

## 2. Cinétique de production avec différentes sources de carbone

En utilisant comme milieu de base (pour la préculture et la culture) le milieu MSS, nous avons testé 5 sources de carbone (l'amidon, le fructose, le glucose, le glycérol et le

saccharose) ajoutées au milieu de culture à raison de 1 % (w/v). Comme source d'azote, de l'extrait de levure est ajouté (2 g/l).

## 2.1. Résultats

Les résultats de l'activité antibiotique, de la biomasse et du pH obtenus en milieu MSS additionné de 5 sources de carbone, sont illustrés par les figures 10 et 11.

- L'activité dans le milieu MSS additionné d'amidon est décelée dès le 2<sup>ème</sup> jour de fermentation contre *Bs* et le 3<sup>ème</sup> jour contre *Lm*, *Sa* et *Ec*. Elle atteint son maximum entre le 5<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de fermentation. Cette activité évolue en corrélation avec la croissance. Le pH tend à diminuer au début puis évolue lentement et atteint son maximum (pH 8,60) le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.

- Le fructose dans le milieu MSS révèle une activité au 2<sup>ème</sup> jour de fermentation contre *Lm*, *Bs* et *Sa*, et au 3<sup>ème</sup> jour contre *Ec*. Au 4<sup>ème</sup> jour, la production est optimale et accompagnée d'une croissance stable et d'un pH croissant le 5<sup>ème</sup> jour pour atteindre 8,60 le 10<sup>ème</sup> jour.

- Dans le milieu au glucose, l'activité apparaît le 2<sup>ème</sup> jour contre *Lm*, *Sa* et *Bs*, et au 3<sup>ème</sup> jour contre *Ec*. La meilleure activité est détectée entre le 4<sup>ème</sup> jour avec une évolution de la croissance. Tandis que le pH tend à diminuer vers le début et augmente jusqu'au 8,50 le 10<sup>ème</sup> jour.

- Le milieu MSS contenant le saccharose, l'activité contre *Lm*, *Sa* et *Bs* est obtenue le 2<sup>ème</sup> jour de fermentation et contre *Ec* le 4<sup>ème</sup> jour. Le meilleur jour de production diffère d'une bactérie à l'autre et la croissance non stable augmente les derniers jours de fermentation.

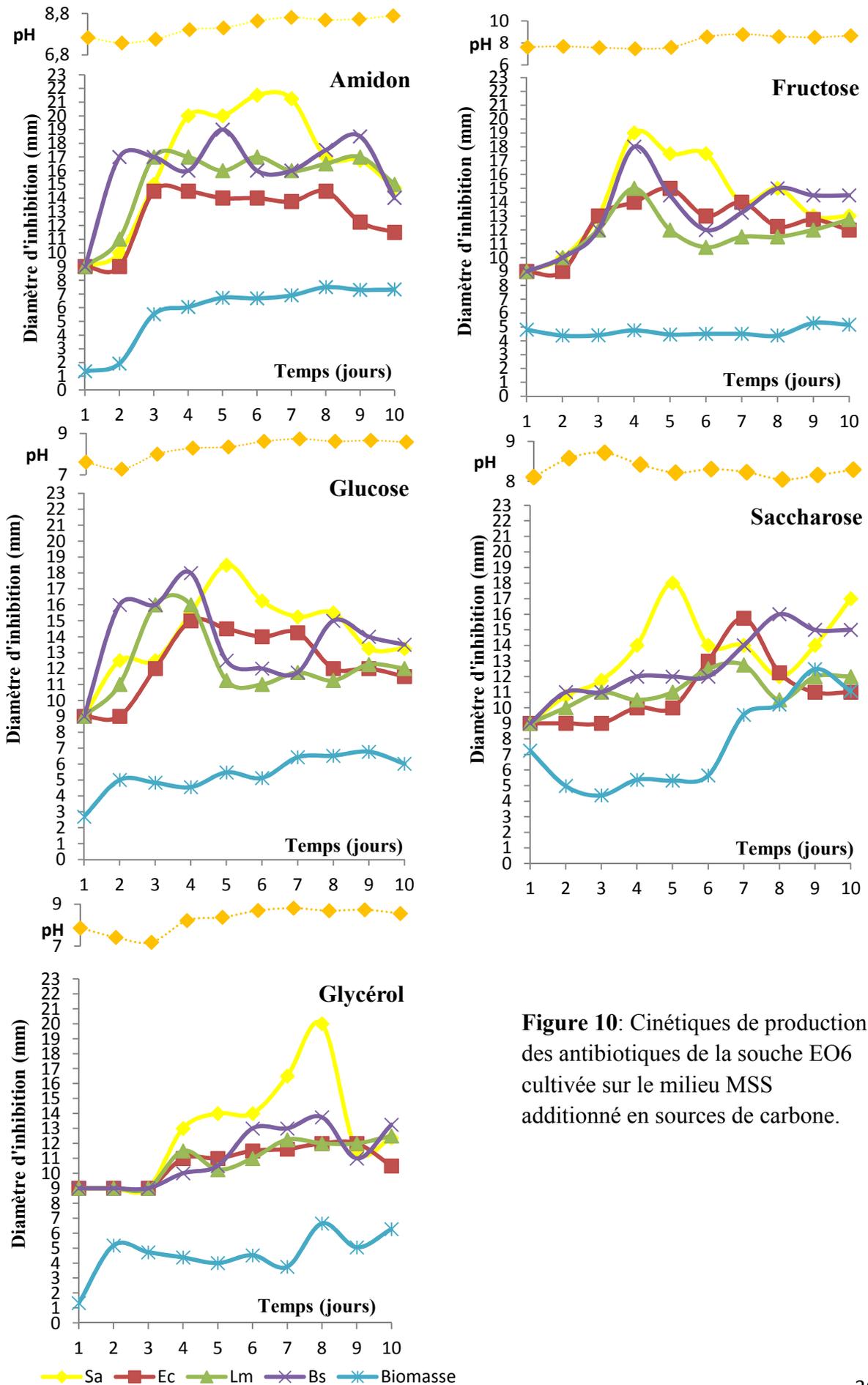
- Avec le glycérol, l'activité n'est détectée qu'à partir du 4<sup>ème</sup> jour de fermentation et cela avec les quatre souches testées. Entre le 4<sup>ème</sup> et le 8<sup>ème</sup> jour, l'activité et la croissance augmentent régulièrement. Le pH tend à diminuer au début puis évolue lentement pour atteindre 8,60 le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.

A partir de ces résultats, nous notons que des zones d'inhibitions (plus au moins importantes) ont été obtenues pour toutes les sources de carbones contre les quatre cibles testées. La plus forte inhibition est observée avec l'amidon. Nous pouvons donc le retenir comme source de carbone pour la prochaine cinétique.

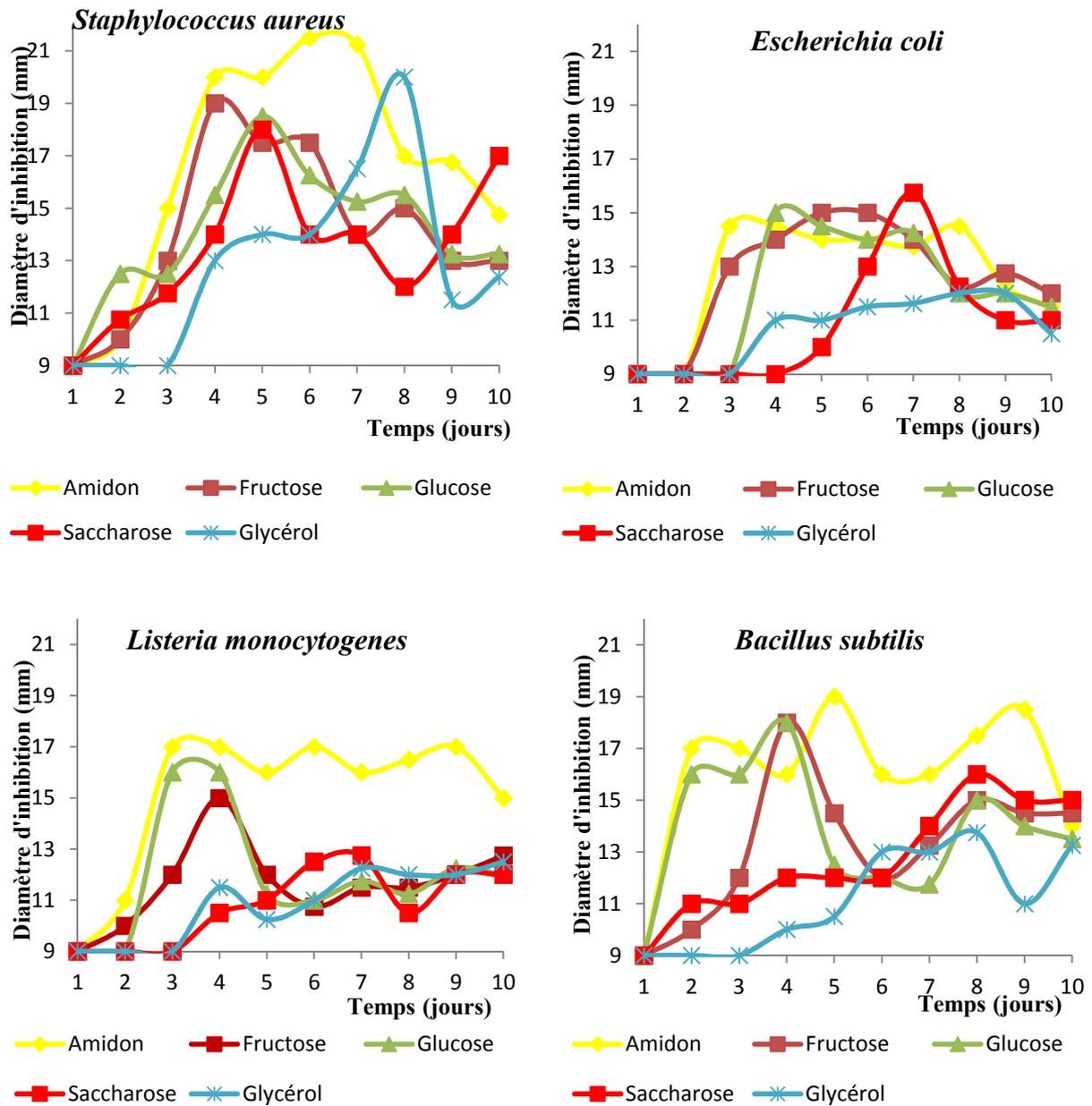
## 2.2. Discussion

La bibliographie en rapport avec l'influence des sources carboné et d'azote sur la production d'antibiotiques est riche (**Khaoua et al., 1991 ; Lebrihi et al., 1988 ; Demain, 1982 ; Aharonowitz, 1980 ; Aharonowitz et Demain, 1979 ; Aharonowitz et Demain, 1978**).

Les résultats de l'amidon (polysaccharide) comme meilleure source de carbone corrélient avec la majorité des travaux (**Lounès et al., 1995 ; Lebrihi et al., 1988**) qui rapportent que les sources de carbone lentement assimilées (plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) permettent de meilleurs rendements de production d'antibiotiques.



**Figure 10:** Cinétiques de production des antibiotiques de la souche EO6 cultivée sur le milieu MSS additionné en sources de carbone.



**Figure 11** : Activité antimicrobienne de la souche EO6 en milieu MSS additionné en sources de carbone (amidon, fructose, glucose, saccharose, glycérol).

Certains sucres rapidement assimilables comme le glucose, le glycérol et le fructose, exercent une action négative sur la biosynthèse des antibiotiques. **Larpen et Sanglier (1989)** rapportent les travaux de plusieurs auteurs, avec de nombreux microorganismes producteurs d'antibiotiques, en rapport avec le phénomène de répression catabolique glucidique, appelé parfois « effet glucose ». Ainsi, le glucose exerce, à une certaine concentration, une répression catabolique sur la production de l'actinomycine, de la bacitracine, de la céphalosporine C, du chloramphénicol, de la kanamycine, de la pénicilline, de la néomycine, etc. L'effet négatif du glycérol et du fructose serait dû à un taux de croissance élevé et à un excès de production d'énergie.

**Aharonowitz (1978)** montre que l'augmentation de la concentration en source carbonée (maltose ou glycérol) de *S. clavuligerus* diminue sensiblement la production de Cephamicine C alors qu'au contraire, des sources de carbone plus pauvres telles que le succinate ou l'alpha-cétoglutarate augmentent cette biosynthèse. De même, chez *S. ambofaciens*, les dextrines permettent une meilleure production spécifique de spiramycine que le glycérol (0,035 mg.gx.h<sup>-1</sup> contre seulement 0,05 mg.gx.h<sup>-1</sup>). L'effet négatif du glycérol serait dû à un taux de croissance élevé et à un excès de production d'énergie. Les sources de carbone lentement assimilées permettraient de meilleurs rendements de production d'antibiotiques (**Lounès et al., 1995**).

A la fin de cette cinétique, nous pouvons déjà retenir l'amidon comme source de carbone optimale pour le milieu MSS.

### 3. Cinétique de production avec différentes sources d'azote

En utilisant le même milieu de base MSS (pour la préculture et la culture), nous avons testé 5 sources d'azote (l'asparagine, la leucine, la caséine, le sulfate d'ammonium et la tryptone) ajoutées au milieu de culture. Comme source de carbone, de l'amidon est ajouté (1 %).

#### 3.1. Résultats

Les résultats de l'activité antibactérienne, de la biomasse et du pH sont illustrés par la figure 12, et montrent que :

- En présence de caséine (source organique complexe), l'activité est décelée dès le 1<sup>er</sup> jour de fermentation contre les quatre bactéries cibles. Elle atteint son maximum le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour de fermentation. Cette activité évolue en corrélation avec une importante croissance qui continue d'augmenter au 10<sup>ème</sup> jour. Le pH tend à diminuer au début puis évolue lentement et atteint son maximum (pH 9,26) le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.
- Avec la leucine (source organique : acide aminé) l'activité est détectée au début de fermentation contre les quatre bactéries. Au 7<sup>ème</sup> jour, la production est optimale. Elle est accompagnée d'une croissance importante, qui était très faible au départ, et d'un pH croissant qui atteint 9,09 le 10<sup>ème</sup> jour.

- L'asparagine (source organique : acide aminé) a montré une activité dès le 1<sup>er</sup> jour de fermentation et cela avec les quatre souches testées. Entre le 6<sup>ème</sup> et le 7<sup>ème</sup> jour l'activité est meilleure et la croissance tend à augmenter. Le pH évolue progressivement pour atteindre 9,2 le 10<sup>ème</sup> jour de fermentation.
- Avec le sulfate d'ammonium (source inorganique), l'activité est importante et apparaît le 1<sup>ème</sup> jour contre *Lm*, *Sa*, *Bs*, et *Ec*. La meilleure activité est détectée le 7<sup>ème</sup> jour de fermentation qui évolue en corrélation avec la croissance. Tandis que le pH tend à diminuer vers le début et augmente de manière progressive pour atteindre 9 le 10<sup>ème</sup> jour.
- L'utilisation de la tryptone (source organique complexe) a permis de déceler une activité le 1<sup>er</sup> jour de fermentation, contre toutes les bactéries sauf la *Ec*. Le meilleur jour de production diffère d'une bactérie à l'autre et la croissance non stable diminue le 5<sup>ème</sup> jour et augmente les derniers jours de fermentation.

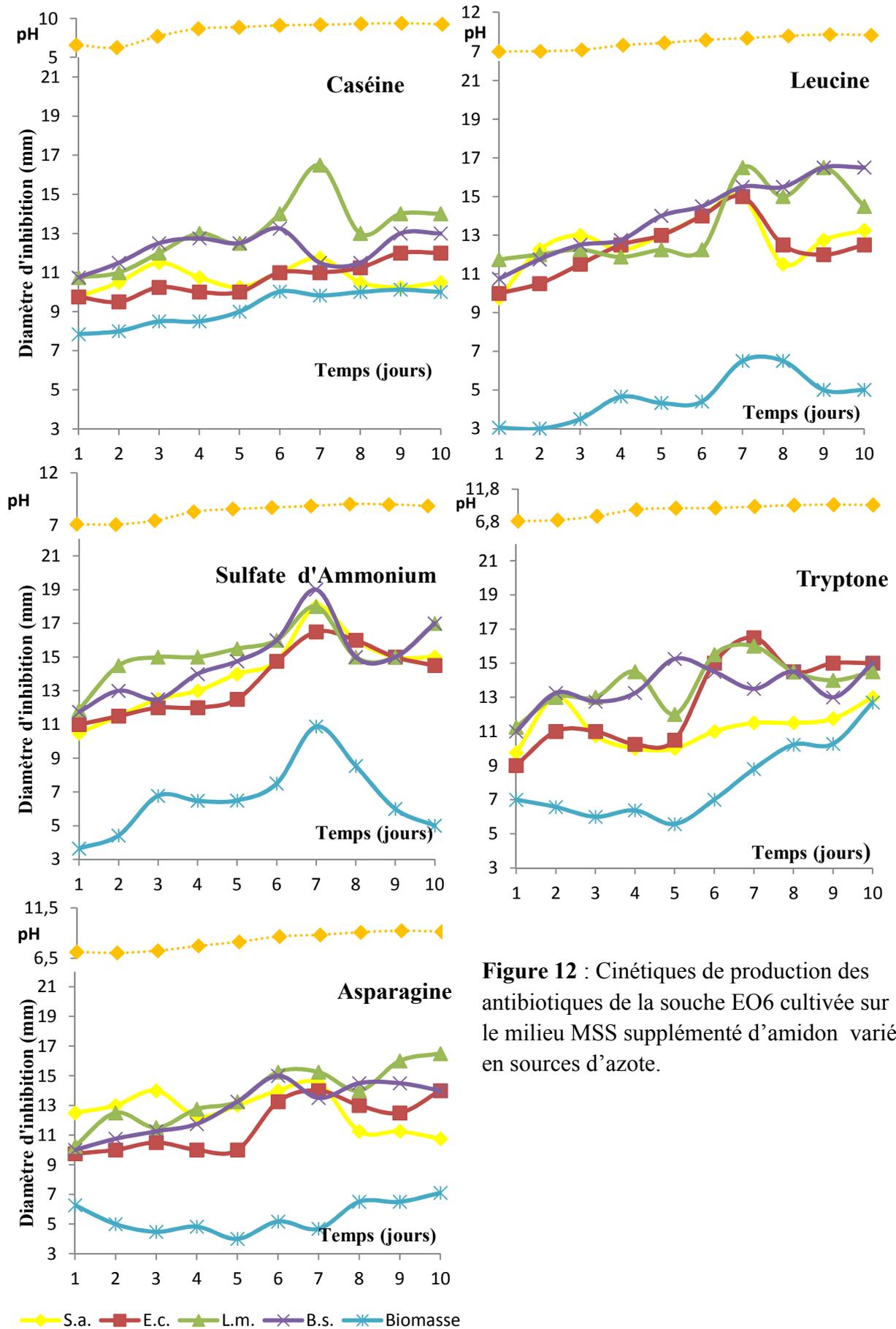
### 3.2. Discussion

Les résultats révèlent des zones d'inhibition importantes à plus ou moins importantes, pendant les 10 jours de fermentation pour toutes les sources d'azote testées contre les quatre cibles bactériennes. Les activités apparaissent dès le 1<sup>er</sup> jour de fermentation avec les cinq sources d'azote.

Les plus fortes inhibitions ont été observées avec la source d'azote inorganique qu'est le sulfate d'ammonium. La concentration utilisée (0,25%) semble être favorable à la production des antibiotiques par la souche EO6. En effet, des travaux rapportent que des concentrations élevées en sels d'ammonium exercent un effet répressif sur la synthèse de la plupart des antibiotiques (**Piret et Demain, 1988 ; Demain, 1982 ; Aharonowitz, 1980 ; Okanishi et Hotta, 1980**).

Les résultats de la caséine sont en accord avec ceux de **Shapiro et Vining (1983)**, qui rapportent que les sources d'azote qui assurent une accumulation rapide de la biomasse donnant de faible taux de synthèse d'antibiotiques. Une croissance rapide et une production élevée de chloramphénicol sont incompatibles.

A ce stade des résultats, nous pouvons donc proposer pour le milieu MSS, le sulfate d'ammonium comme source d'azote favorable à la production d'antibiotiques par la souche EO6, avec arrêt de la culture pour les extractions le 7<sup>ème</sup> jour (jour de production optimale).



**Figure 12 :** Cinétiques de production des antibiotiques de la souche EO6 cultivée sur le milieu MSS supplémenté d'amidon varié en sources d'azote.

#### 4. Discussion générale

La production d'antibiotiques est influencée par de nombreux paramètres, nutritionnels et physicochimiques. Les composants du milieu de culture exercent une grande influence sur cette production. Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone et d'azote affectent fortement cette production.

Différentes études menées sur des milieux de culture ont montré que la production d'antibiotiques pouvait être associée à la croissance (complètement ou partiellement) ou au contraire dissociée de la croissance (**Pamboukian and Faciotti, 2004 ; McIntyre *et al.*, 1996 ; Fazeli *et al.*, 1995 ; Untrau-Taghian *et al.*, 1995 ; Mc Dermott *et al.*, 1993 ; Lebrihi *et al.*, 1988 ; Vu-Trong and Gray, 1981 ; Bu'lock *et al.*, 1975**). Ainsi, ces études ont montré que la production d'antibiotiques pouvait avoir lieu avec une croissance non nulle mais que la production était meilleure à des taux de croissance faibles. Ces mêmes études rapportent que le profil de production (production dissociée de la croissance, partiellement associée ou complètement associée) est dépendant du milieu de culture utilisé.

L'épuisement des sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par certains nutriments (**Martin and Demain 1980**).

Il est à signaler que le contrôle des conditions de culture (quantité de spores à l'inoculation, préculture, pourcentage d'inoculation, volume utile des cultures, biomasse produite, aération, pH) est déterminant pour la reproductibilité des résultats. Mais ce contrôle est difficile en fioles d'Erlenmeyer. L'un des problèmes pourrait être du à une limitation en oxygène au cours de la culture. L'ajustement à la demande, en oxygène dans le système fiole d'Erlenmeyer / agitateur peut certes être obtenu par diminution de la concentration en biomasse, mais il est cependant impossible de contrôler l'apport d'oxygène en cours de culture. Toutefois, la difficulté d'obtention de cultures reproductibles en fioles d'Erlenmeyer ne doit pas remettre en cause l'utilisation de ce procédé. Pour des études d'optimisation et de régulation plus approfondies, le fermenteur est utilisé pour maîtriser tous les paramètres de la culture (oxygène, agitation, pH...).

Nous pouvons donc proposer à la fin de cette étude :

- le milieu MSS additionné d'amidon comme source de carbone et de sulfate d'ammonium comme source d'azote, avec extraction le 7<sup>ème</sup> jour de fermentation et le milieu complexe Bennett, avec extraction le 5<sup>ème</sup> jour de la culture sont les milieux qui conviennent pour la production des antibiotiques.

- Et éventuellement ; le milieu complexe ISP2, avec extraction le 10<sup>ème</sup> jour de la culture.

Cette étude préliminaire sur l'évolution de la production d'antibiotique, de la croissance et du pH en fonction des milieux de culture peut constituer l'ébauche d'une démarche visant à l'optimisation d'un milieu de production. Une telle optimisation nécessiterait des expérimentations faisant appel à des tests de plusieurs constituants du milieu et à différentes concentrations. Tel n'est pas notre objectif. Notre étude a, par contre, permis de proposer des

milieux de culture de production pour la souche EO6 qui pourraient être utilisés pour des études plus approfondies.

## IV. EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES

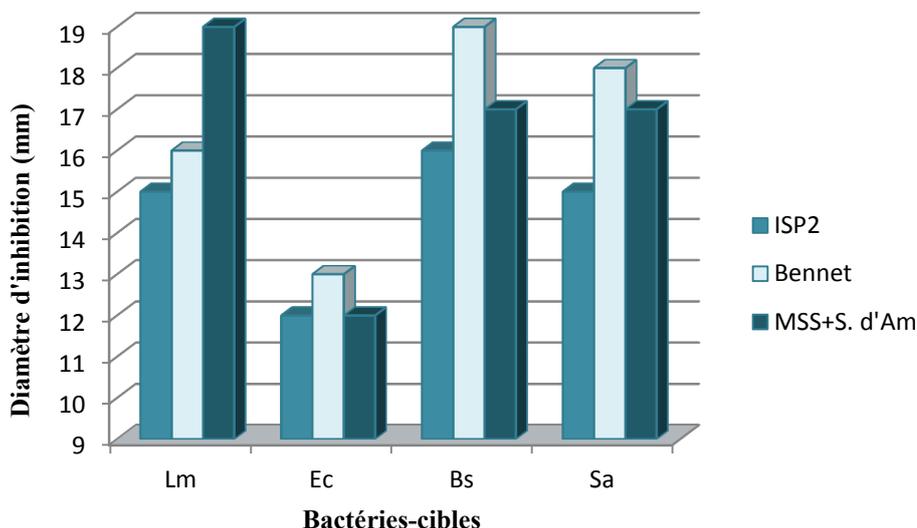
L'extraction des activités antibactériennes est effectuée à partir des 3 meilleurs milieux, à savoir le milieu MSS à base d'amidon et de sulfate d'ammonium, le milieu Bennett et le milieu ISP2. Les activités sont extraites à partir du filtrat de culture et du mycélium et ce au jour de production optimale déterminé lors des cinétiques.

### 1. Résultats

#### 1.1. Extraction à partir du mycélium

L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium est réalisée au méthanol. L'extrait a une couleur jaune comme la couleur initiale du mycélium. Les extraits méthanoliques révèlent une bonne activité. Ce test d'antibiogramme a été réalisé par la méthode des disques de papier et le diamètre du disque (9 mm) est compris dans les valeurs indiquées.

La figure 13 montre que l'activité est plus importante dans le mycélium de la souche cultivée dans le milieu Bennett que dans le milieu ISP2 et cela contre les 4 bactéries-cibles, l'activité dans le mycélium est aussi très importante lors de la fermentation sur le milieu MSS supplémenté en amidon qu'est la meilleure source de carbone et en sulfate d'ammonium comme meilleure source d'azote. L'activité des extraits varie toujours selon la bactérie-cible.



**Figure 13 :** Activité des extraits méthanoliques du mycélium de la souche EO6 de *Streptomyces sp.* cultivée sur ISP2, Bennett et MSS.

## 1.2. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction est effectuée avec 3 solvants organiques de différentes polarités, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le *n*-butanol. Des filtrats de culture (200 ml chacun) de la souche EO6 (en milieu ISP2, Bennett et MSS amidon sulfate d'ammonium) sont répartis en 3 fractions de 65 ml. Chaque fraction est extraite avec deux fois 65 ml de solvant (double extraction). Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses et testées pour leur antagonisme par la méthode des disques de papier et les phases aqueuses par la méthode de diffusion des puits. Les activités sont détectées dans les phases aqueuses et organiques de chaque milieu.

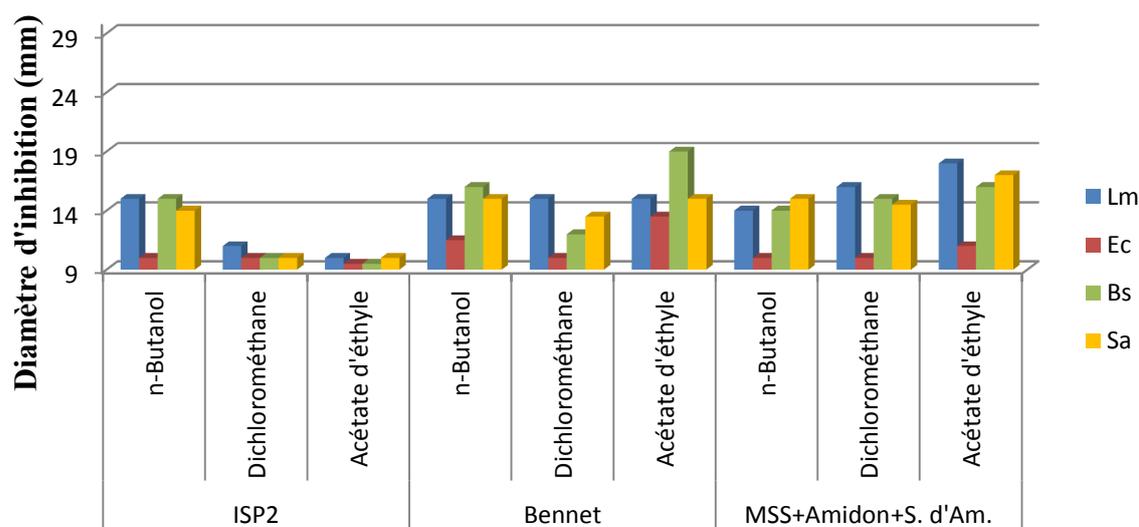
### 1.2.1. Extraits organiques

Les résultats de la double extraction des antibiotiques par les trois solvants et à partir des trois meilleurs milieux de production d'antibiotiques choisis sont illustrés par la figure 14. Ces résultats montrent que :

- Les bactéries-cibles les plus sensibles sont *Bacillus subtilis*, *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus*. *Escherichia coli* est inhibée faiblement par les trois extraits des trois solvants de chaque milieu mais fortement inhibé par l'extrait d'acétate éthyle à partir de Bennett.

- L'activité antibactérienne est retrouvée dans les extraits des trois solvants. Avec le milieu ISP2, la capacité d'extraction du dichlorométhane et d'acétate éthyle sont faibles et proches, mais importante avec le *n*-Butanol. Pour les deux milieux Bennett et MSS supplémenté d'amidon et du sulfate d'ammonium, la capacité d'extraction des antibiotiques est assez proche entre les trois solvants, avec cependant une légère préférence pour l'acétate d'éthyle en général et une moins bonne pour le dichlorométhane avec le Bennett, et le *n*-Butanol avec MSS supplémenté.

Pour la suite de notre étude, nous avons donc retenu le *n*-butanol comme solvant d'extraction d'antibiotique à partir d'ISP2 et l'acétate d'éthyle comme solvants d'extraction des activités antibiotiques à partir de Bennett et MSS.

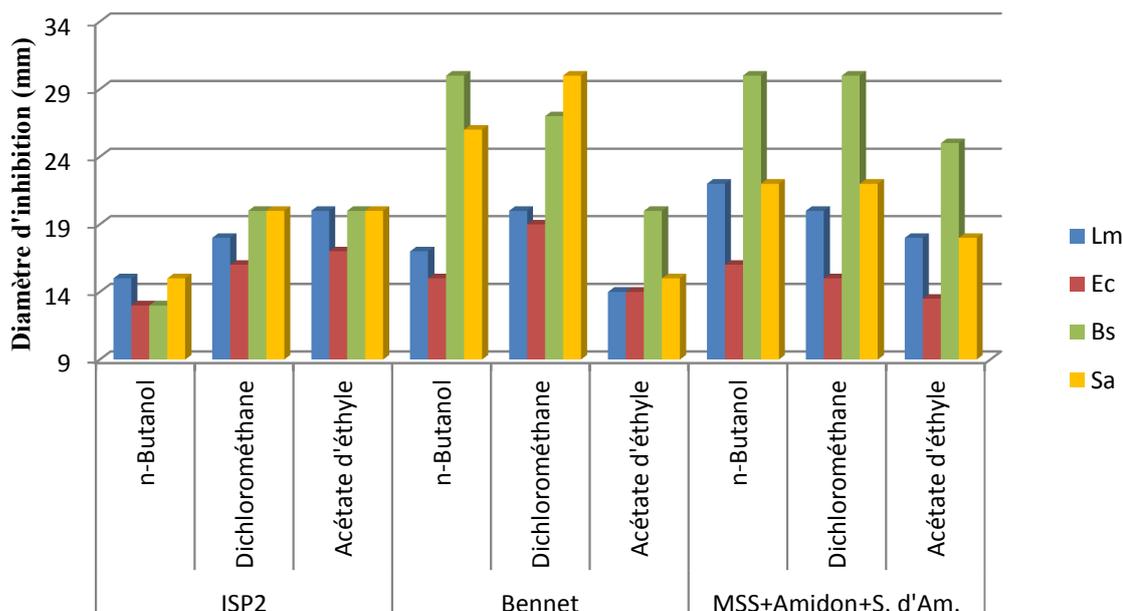


**Figure 14:** Activité des extraits organiques de la souche EO6 *Streptomyces* sp.

**Note :** Les résultats : 0 mm, des témoins négatifs (disques vierges imbibés avec du méthanol) ne sont pas représentés par la figure. Les résultats des témoins positifs (disques d'antibiotiques) sont donnés en annexe 3. Les diamètres d'inhibition comprennent le diamètre des disques en papier (09 mm).

### 1.2.2. Extraits aqueux

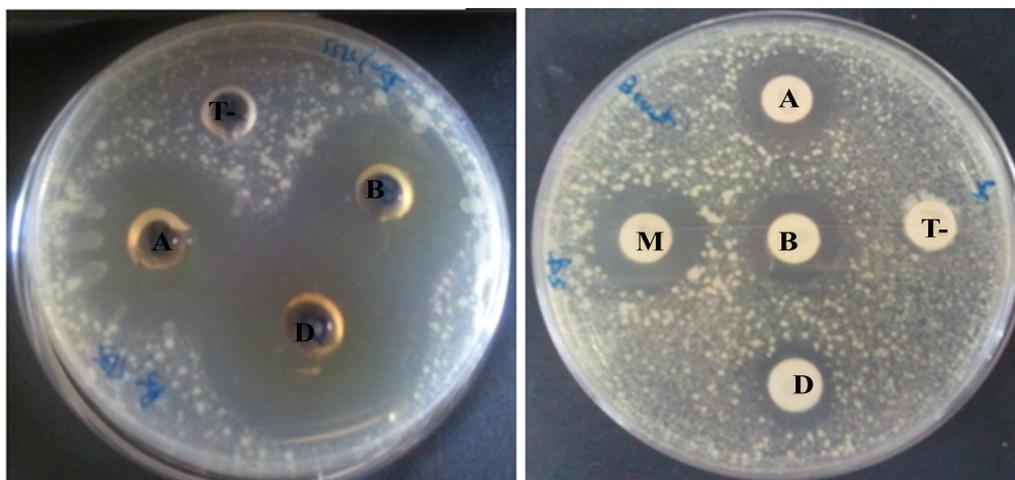
Après une double extraction des filtrats de culture par chacun des trois solvants, une forte activité antibactérienne reste présente dans la phase aqueuse, ce qui suggère la présence d'un antibiotique dans la phase aqueuse non extractible (ou peu) par les trois solvants utilisés.



**Figure 1 :** Activité des extraits aqueux de la souche EO6 de *Streptomyces* sp.

**Note :** Les résultats : 0 mm, des témoins négatifs (eau distillée stérile) ne sont pas représentés par la figure. Les résultats des témoins positifs (disque d'antibiotiques) sont donnés en annexe 3.

Les diamètres d'inhibition comprennent le diamètre des puits (9 mm).



**Figure 16 :** Antibiographie contre *Bacillus subtilis* des extraits aux 3 solvants organiques (à droite) et aqueux (à gauche) des cultures de la souche EO6 de *streptomyces* sp. poussant sur milieu Bennett.

**Note :** M : extrait méthanolique du mycélium, A : extrait à l'acétate éthyle, B : extrait au *n*-Butanol, D : extrait au dichlorométhane. T- : témoin négatif.

## V. DETECTION DES ANTIBIOTIQUES PAR BIOAUTOGRAPHIE

### 1. Résultats

Après extraction des antibiotiques du mycélium avec le méthanol, du milieu ISP2 avec le *n*-butanol et ceux de Bennett et MSS additionné d'amidon et de sulfate d'ammonium avec l'acétate d'éthyle, la phase organique de chaque extrait est analysée par chromatographie sur couche mince de gel de silice G60. Les activités antibiotiques sont détectées par bioautographie. Deux systèmes de solvants de migration sont testés ; l'acétate d'éthyle/méthanol (A.M) et butanol/acide acétique/eau (B.A.E).

Dans les extraits au méthanol, à *n*-Butanol et à l'acétate d'éthyle, plusieurs taches ont été détectées.

- Avec le système solvant de migration B.E.A. (représenté par la figure 17) :

Une tache active de l'extrait butanolique à partir d'ISP2 est détectée d'un  $R_f = 0,96$  et a une forte activité sur le *Bs*.

Le spot d'extrait du Bennett avec l'Acétate d'éthyle a donné deux taches de faible activité et des  $R_f = 0,82$  et  $0,89$ .

L'extraction avec l'acétate d'éthyle à partir de MSS a donné une seule tache active moyennement d'un  $R_f = 0,82$ .

Deux taches ont été détectées avec l'extrait méthanolique du mycélium dont les  $R_f = 0,82$  et  $0,96$ .

La plus part des taches actives apparaissaient jaune-brunâtre à l'œil nu et violettes ou jaunes aux U.V.

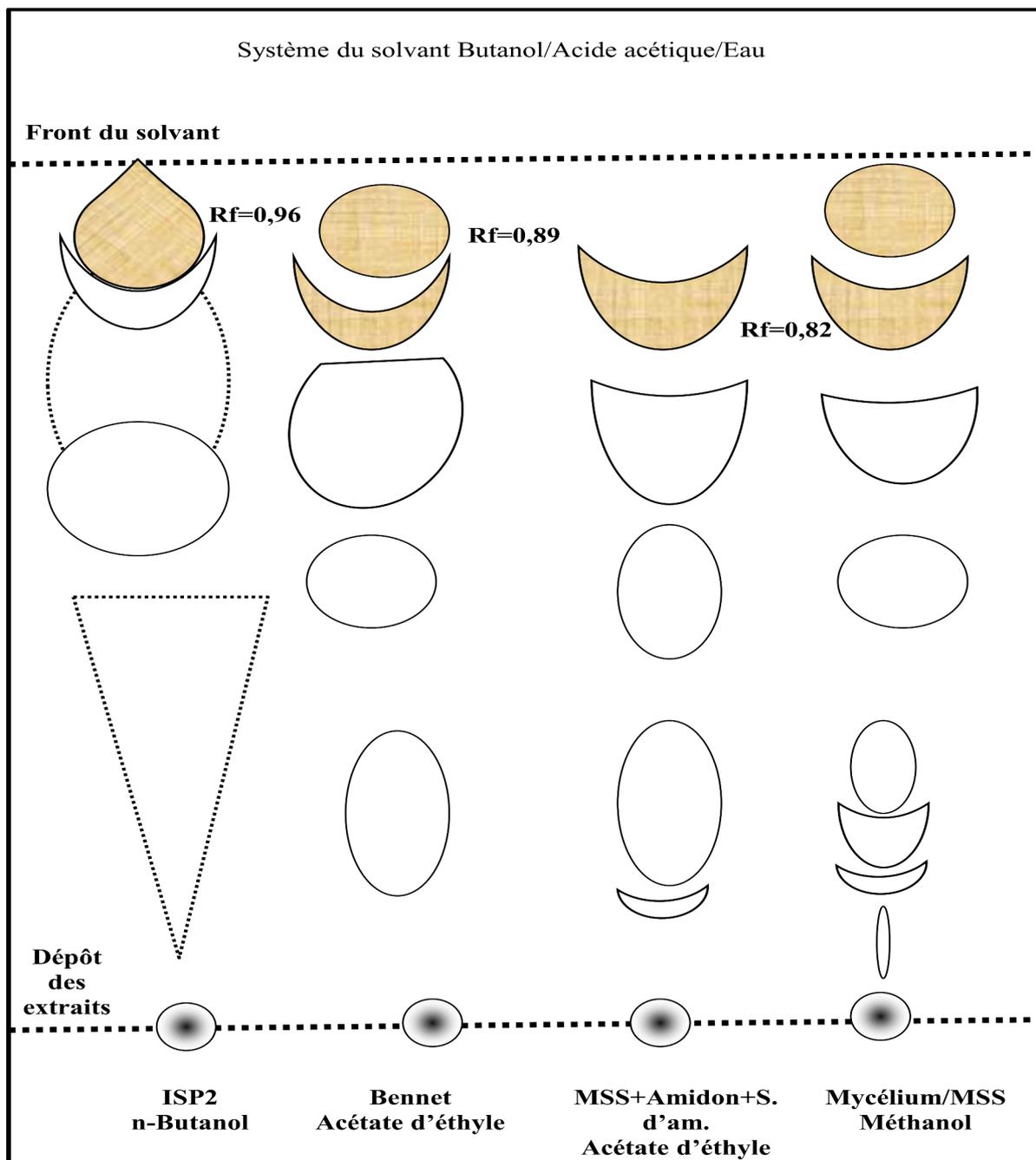
- Avec le système du solvant A.M. (représenté par la figure 18) :

L'extrait d'ISP2 a donné trois taches actives, deux qui sont fortes ( $R_f = 0,78$  et  $0,57$ ) et une de moyenne activité et un  $R_f = 0,42$ .

Trois tâches dont les activités sont moyenne, forte et faible sont détectées avec l'extrait Bennett, et leurs  $R_f = 0,71$ ,  $0,67$ ,  $0$  respectivement.

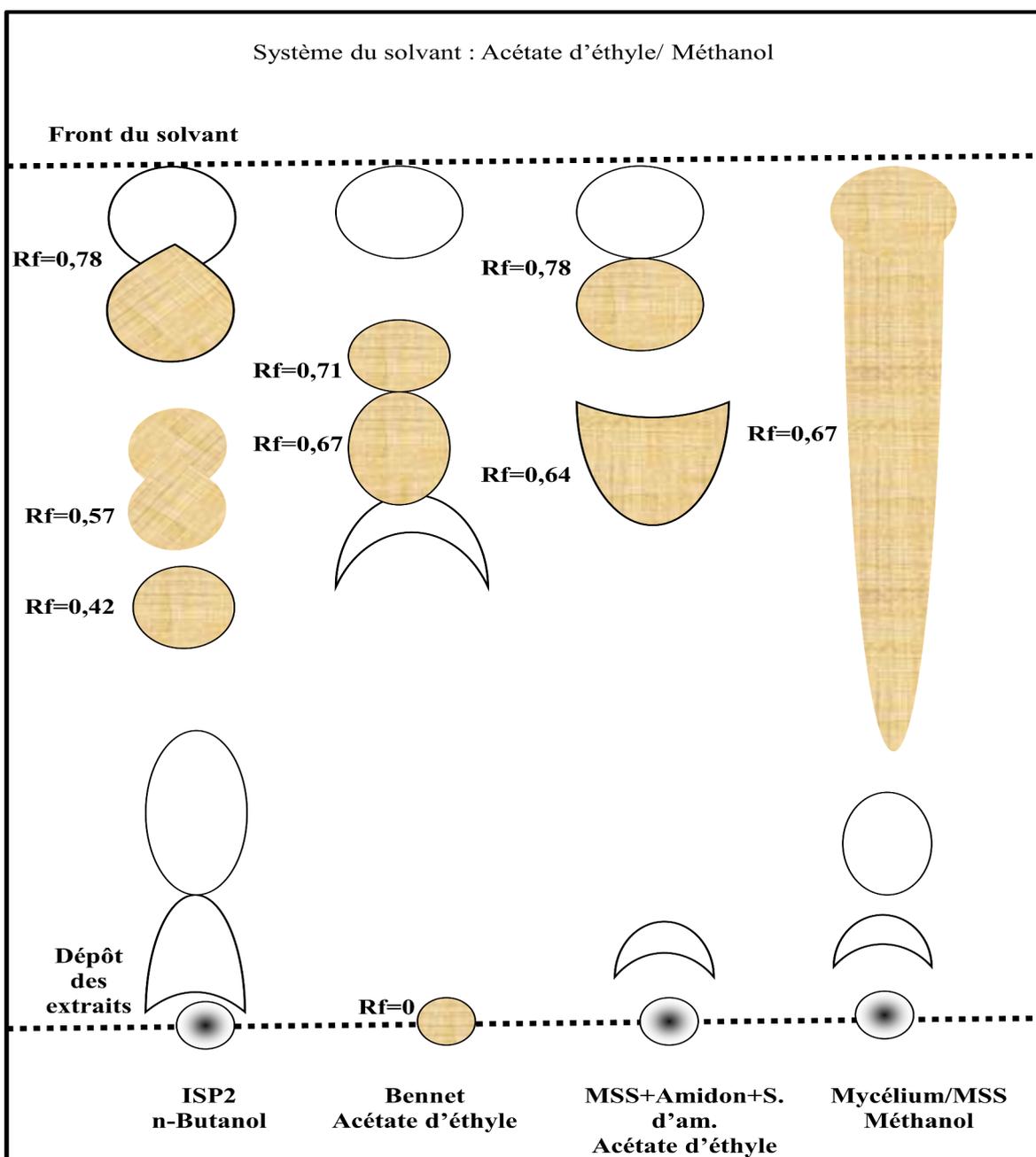
L'extrait du MSS révèle deux taches actives à  $R_f = 0,67$  très forte et  $0,78$  forte.

L'extrait méthanolique du mycélium a donné une longue tache (trainée active très longue) d'un  $R_f = 0,67$ .



**Figure 17 :** Localisation par bioautographie avec le solvant B.A.E., des antibiotiques actifs contre *Bacillus subtilis* provenant des extraits organiques des filtrats de culture et du mycélium de la souche EO6 de *Streptomyces* sp.

Les zones colorées sont des taches actives contre *Bs*. Les zones transparentes sont des taches inactives détectées sous U.V. à 254 nm (absorbance).



**Figure 18:** Localisation par bioautographie avec le système de solvant A.M., des antibiotiques actifs contre *Bacillus subtilis* provenant des extraits organiques des filtrats de culture et du mycélium de la souche EO6 de *Streptomyces* sp.

Les zones colorées sont des taches actives contre *Bs*. Les zones transparentes sont des taches inactives détectées sous U.V. à 254 nm (absorbance).

## 2. Discussion

L'analyse des résultats de bioautographie, révèle que les taches actives à des *Rf* différents signifient la présence de plus d'un antibiotique. Même si une tache active est obtenue, seule l'analyse par HPLC ou une autre méthode de purification (UPLC) peut déterminer le nombre d'antibiotiques présents. Les taches ayant le même *Rf* ne correspondent pas forcément au même antibiotique.

Le meilleur système de solvant s'avère être l'acide acétique – méthanol, car il a pu détecter plus d'une tache pour chaque extrait contrairement au système B.A.E. Cependant, ce dernier a mieux séparé les composants d'extrait méthanolique du mycélium en révélant deux taches, en comparaison avec le système A.M., dans lequel la tache est restée au dépôt (absence de migration).

La bioautographie avec le système de solvant A.M. effectuée contre *B. subtilis* à partir de l'extrait méthanolique du mycélium a donné une mauvaise séparation des antibiotiques (trainées actives très longues). Ceci est probablement dû aux substances lipidiques membranaires ou autres (gênantes) extraites par le méthanol. Pour des travaux ultérieurs, les extraits organiques des filtrats de culture ou aqueux sont choisis de préférence.

Il est à signaler que l'activité obtenue contre *Bs* avec la bioautographie confirme les résultats des cinétiques de production des antibiotiques sur les trois milieux de culture ISP2, Bennett et MSS.