

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie
Filière : Sciences biologiques
Option : Génie biologique



Réf

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

MASTER

Thème

**Mise en évidence d'activités biologiques
d'une souche d'actinomycète isolée de
sédiments marins.**

Présenté par :

YOUS Kahina & BENDRIS Ouarda

Soutenu le : 22 juin 2017

Devant le jury composé de :

M^{lle} DJINNI I.
M^r KECHA M.
M^{me} CHIBANE N.

MCB
Pr
MAA

Présidente
Encadreur
Examinatrice

Année universitaire: 2016/2017



Remerciements

Avant tout nous remercions **ALLAH** le tout puissant, qui nous a donné le courage, la volonté, la force, la santé et la patience pour réaliser ce travail.

Nous tenant à remercier très sincèrement **Pr KECHA M** pour nous avoir encadré, en nous faisant bénéficier de ces connaissances, de son aide et ses conseils.

Nos remerciements s'adresse à **Pr BENALLAOUA S**, responsable du Laboratoire de Microbiologie Appliquée, pour nous accepté au sein de son laboratoire.

Nous remercions, particulièrement, **M^{me} BOUDRAHEM D** pour ses encouragements et ses conseils qui nous sont beaucoup aidé pour réaliser ce travail et pour nous avoir aidés au laboratoire, nous leur témoigne tous ma gratitude.

Nous exprimons aussi nous remerciments à **M^{me} Fouzia et M^{me} Zohra** pour ses aides.

Nous tenons à exprimer notre gratitude, notre profond respect et notre remerciements aux membres de jury : **M^{lle} DJINNI I.** qui nous à fait honneur par sa présence en qualité de président de jury. **M^{me} CHIBANE N** qui est accepté de faire partie de ce jury et d'examiner ce travail et consacré de leur temps pour son évaluation.

Notre gratitude s'adresse à tout le personnel de laboratoire de LMA pour leurs aides et leurs encouragements.

Ces remerciements ne seront pas complets sans associés toutes les personnes ayant contribués, de prés ou de loin à la réalisation de ce travail.

DÉDICACE

Avant tout, je remercie 'Dieu'
de m'avoir donné le courage et la volonté pour réaliser
ce modeste travail ; que je dédie :

■ À ceux que j'aime :

Ma mère et mon père ; sans eux je n'aurai pas abouti à ce stade
d'étude, que Dieu m'aide à les honorer, les servir et les combler.

■ À ceux que j'aime et que j'adore :

Mes sœurs Ghania et Sihem d'où je m'inspire le courage et leurs maris
Mes frères Abd nour et sa femme, Mouhamed et ça femme, Hocine et
sa femme et Bilal;

■ Les poussins Walid, Islam, Mariame, Nada, Abderrahmane, Sami et
céline ;

■ Mes tantes et mes oncles ;

■ À ma binôme Ouarda et toute sa famille ;

■ À Dania et Basma.

■ À tous mes amis, en particulier Ibtissam, Dahbia, Zina, Sakina,
Ouissam, Naima, Fousia, Sabrina, Souade, Hmama , Denia, Charihan,
Hadjira, Amal, Yasmina.....

■ À toute la promotion de Génie Biologique sans exception.

■ À tous ceux qui ont contribué de loin ou de près à la
réalisation de ce mémoire.

■ Enfin, à tous ceux qui m'aiment.

■ À vous...

Merci

KAHINA



DÉDICACE



A mon très chère père Mouloud, mon exemple dans cette vie, qui ma toujours soutenu et encourager et qui est toujours présent pour moi.

A la plus chère au monde, ma mère Rabiaa qui a toujours encouragé durant mes études, je demande a dieu de les protéger et leur réserver une longue vie.

A mes Très chères sœurs : Hada et son mari, Salima et Sohila.

les poussins : Adam, Hawa, Walid , Basma, Sifo.

A mes Très chères frères : Hamza, Adal, Amar, Djimi, Hawas et ça femmes Noura.

A mon fiancé Halim qui ma toujours soutenu m'encouragé

A toute ma famille Bendris et Khaled.

A ma binôme et toute sa famille.

A tous mes amis, en particulier Maryam.



OUARDA

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Introduction.....1

Chapitre I : Synthèse bibliographique

1. Généralités sur les actinomycètes.....3

2. Taxonomie et classification d'actinomycète.....3

2.1. Taxonomie.....3

2.2. Classification.....5

3. L'intérêt des actinomycètes marin.....6

3.1. Dans l'environnement et agriculture.....6

3.2. Dans le domaine pharmaceutique.....6

3.3. En biotechnologique.....6

4- Métabolites bioactifs produit par les actinomycètes.....7

➤ Les antibiotiques.....7

➤ Les enzymes.....7

➤ Les substances antioxydants.....8

➤ Les probiotiques.....8

Chapitre II : Matériel et méthodes

I. Matériel.....	9
1. Matériel analytique (voire annexe I)	
2. Matériel biologique.....	9
2.1. Microorganisme test «souche d'actinomycète SR1».....	9
2.2. Germes cibles.....	9
II. Méthodes.....	9
1. Revivification de la souche d'actinomycète SR1.....	9
2. Caractérisation de la souche d'actinomycète SR1.....	9
❖ L'étude macromorphologique.....	9
❖ L'étude micro morphologique.....	10
❖ L'étude physiologique.....	10
❖ L'étude biochimique.....	11
3. Mise en évidence les activités antibactérienne et antifongique.....	13
❖ Standardisation des inocula bactériens.....	13
3. 1. Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'agar.....	14
Standardisation des inocula de moisissures.....	15
3.2. Mise en évidence l'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des puits.....	15
4. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotiques.....	16
5. Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	16
❖ L'activité cellulasique.....	16
❖ L'activité xylanasiq.....	16

❖ L'activité L-asparaginase.....	16
❖ L'activité chitinasique.....	17
6. Mise en évidence de l'activité antibiofilm de la souche SR1.....	17
7. Mise en évidence de l'activité antioxydante.....	18

Chapitre III : Résultats et discussion

1. Caractérisation de la souche d'actinomycète SR1.....	19
❖ L'étude macromorphologique.....	19
❖ L'étude micro morphologique.....	21
❖ L'étude physiologique.....	22
❖ Etude biochimique.....	25
2. Mise en évidence les activités antibactérienne et antifongique.....	29
3. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotique.....	31
4. Mise en évidence de l'activité enzymatique.....	31
❖ Mise en évidence de l'activité cellulasique.....	31
❖ Mise en évidence L'activité xylanase.....	32
❖ Mise en évidence L'activité L-asparaginasique.....	33
❖ Mise en évidence L'activité chitinasique.....	34
5. Antibiofilms.....	34
6. Antioxydants.....	35
Conclusion.....	37

Références bibliographiques

Annexes

Liste des abréviations

- + **Asp** : *Aspergillus*
- + **ATCC** : **A**merican **T**ype **C**ulture **C**ollection
- + **B. subtilis** : *Bacillus subtilis*
- + **BN** : **B**ouillon **N**utritive
- + **C** : **C**hloramphénicol
- + **CMC** : **C**arboxyl **M**ethyl **C**ellulose
- + **D.A.P**: **A**cide 2,6-**d**iaminopimélique
- + **DPPH** : **D**iphényle-**P**icryl-**H**ydrazyl
- + **E. coli** : *Escherichia coli*
- + **FA¹⁰**: **A**cide **F**usidique
- + **G**: **G**rossissement
- + **GAE / ml** : **E**quivalent d'**A**cide **G**allique par
- + **GEM** : **G**élose à l'**E**xtrait de **M**alt
- + **GN**: **G**élose **N**utritive
- + **GYEA**: **G**lucose-**Y**east-**E**xtract-**A**gar
- + **ISP**: **I**nternational *Streptomyces* **P**roject
- + **LMA**: **L**aboratoire de **M**icrobiologie **A**ppliquée
- + **MA** : **M**ycélium **A**érien
- + **MH** : **M**ueller-**H**inton
- + **MS** : **M**ycélium du **S**ubstrat
- + **ND** : **N**on **D**éterminé
- + **Néo**: **N**éomycine
- + **NR** : **N**itrate **R**éductase
- + **OGA** : **O**xytetracycline **G**lucose **A**gar
- + **RA** : **R**etinaculum
- + **REF** : **R**ifampin
- + **RF** : **R**ecutus-**F**lexibilis
- + **S**: **S**treptom
- + **S.aureus** : *Staphylococcus.aureus*
- + **SCA** : **S**tarch **C**asein **A**gar
- + **UFC/ml** : **U**nité **F**ormant **C**olonies par **M**illilitre
- + **VA³⁰** : **V**ancomycine

Listes des figures

Figure N° 01 : Types de structure de la spore portée par les streptomycètes.....	4
Figure N° 02 : Mise en évidence de l'activité d'antibiotique de l'isolat d'actinomycète.....	14
Figure N° 03 : Observation sous microscope optique au grossissement (x40) des mycélia aériens de la souche d'actinomycète SR1 cultivée pendant 14 jours sur le milieu ISP2 et ISP4.....	21
Figure N° 04 : Photographie illustrant le test d'antibiogramme de la souche SR1 après 7 ^{ème} à 14 ^{ème} jour d'incubation respectivement.....	25
Figure N° 05: Photographie illustrant la dégradation de quelques sucres et acides aminés par la souche SR1.....	27
Figure N° 06 : Photographie illustrant l'activité de la souche vis-à-vis <i>Asp. niger</i> avec l'activité et après leur débuts de la disparation de celle-ci respectivement.....	30
Figure N° 07 : Activité antibiofilms de surnageant de culture d'actinomycète.....	35
Figure N° 8 : Activité antioxydante de surnageant en polyphénols de la souche SR1.....	35

Listes des figures annexes

Figure N° 09 : Evolution de l'absorbance en fonction du dilution chez <i>S.aureus</i>	
Figure N° 10 : Evolution de l'absorbance en fonction du dilution chez <i>E.coli</i>	

Liste des tableaux

Tableau N° 1: Classification des actinomycètes selon le “Bergey’s Manual de systematique Bactériologique, 2012”	5
Tableau N° 2 : Les antibiotiques testés à l’égard de souche d’actinomycète.....	11
Tableau N° 3 : Croissance de la souche SR1 sur différents milieux de culture après 7 jours....	19
Tableau N° 4: Croissance de la souche à différentes concentration de NaCl toutes les 24h....	22
Tableau N° 5 : Croissance de la souche SR1 à différentes valeur de pH après 7 jours.....	22
Tableau N° 6 : Croissance de la souche SR1 à différent températures après 21 jours.....	23
Tableau N° 7 : Résistance ou la sensibilité de la souche SR1 aux différents agents chimique après 21 jours	24
Tableau N° 8 : Résistance ou la sensibilité de la souche SR1 aux différents antibiotiques 7et 14 jours.....	24
Tableau N° 9 : Teste d’hydrolyse des macromolécules par la souche SR1.....	26
Tableau N° 10 : Dégradation des sucres et des acides aminés par la souche SR1 après 21 jours.....	27
Tableau N° 11: Décarboxylation des sels de sodium par la souche SR1 après 21 jours.....	28
Tableau N°12: Résultats des testes de production de pigments mélanoïde ,de la nitrate réductase et recherche de catalase.....	29
Tableau N° 13 : Mise en évidence de l’activité cellulasique de la souche SR1.....	32
Tableau N° 14 : Mise en évidence de l’activité xylanase de la souche SR1.....	33
Tableau N° 15 : Mise en évidence l’activité L-asparaginasique de la souche SR1.....	33
Tableau N° 16 : Mise en évidence l’activité chitinasique de la souche SR1.....	34

Liste des tableaux annexe

Tableau N° 17 : Croissance de la souche SR1 sur différents milieux de culture après 14 jours

Tableau N° 18 : Croissance de la souche SR1 sur différents milieux de culture après 21 jours

Tableau N°19: croissance à différents pH après 14 jours et 21 jours

Tableau N° 20 : Résultat de test d'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des cylindres d'agar et des puits

Introduction

Introduction

Les microorganismes sont omniprésents dans notre environnement (le sol, l'air et les eaux) et ne cessent d'occuper une place de plus en plus importante dans notre vie et sont actuellement à l'origine de l'essor du domaine de la biotechnologie (Smaoui, 2010).

Parmi ces microorganismes, les actinomycètes ont acquis une importance particulière, car ils sont la source la plus importante pour la productions d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires bioactifs (Sudo et al., 1995; Sanglier et al., 1996 ; Takahashi et Omura, 2003 et Kitouni et al., 2005 ;Valan et al., 2008), ils sont connus pour être à l'origine de la production d'environ 80% des antibiotiques commercialisés (Bérdy, 2005).

Les antibiotiques sont parmi les médicaments les plus prescrits dans le monde, mais leur efficacité est confrontée à des préoccupations cliniques graves, surtout en raison de l'émergence de bactéries résistantes (Maestro et Sanz, 2007), et suite à ce problème les chercheurs se sont orientés vers l'exploitation de nouvelles niches écologiques notamment les milieux salins et hyper salins dans le but de trouver de nouvelles souches productrices de ces substances. Blunt et al., (2006) ont rapporté que les diverses bactéries halotolérantes et halophiles sont une source précieuse pour la découverte de composés bioactifs ayant des structures uniques.

Les actinomycètes d'origine marins sont une bonne source de métabolites secondaires et pour la découverte de nouveaux antibiotiques (Manivasagan et al., 2014; Blunt et al., 2016).

Bien que les actinomycètes soient capables de se développer sur des substrats naturels variés, toutefois, des études d'optimisation doivent être réalisées afin d'améliorer leur croissance à l'échelle de laboratoire, par la détermination des conditions physiologiques et nutritionnelles amenant à une croissance optimale d'une part, et pour une production maximale de molécules bioactives d'autre part (Niladevi et al. 2008).

L'objectif de notre étude est la mise en évidence des activités biologiques d'une souche d'actinomycète isolée d'un milieu marin et appartenant à la collection du LMA.

La première partie est consacrée à la synthèse bibliographique, là où on décrit des généralités sur les actinomycètes, leur taxonomie et classification et leur intérêt, ainsi qu'un aperçu sur leurs métabolites bioactifs.

Introduction

La deuxième partie regroupe l'ensemble des techniques et méthodologies utilisées.

La troisième partie porte sur les résultats et la discussion, suivi par une conclusion générale.

*Synthèse
bibliographique*

1. Généralités sur les actinomycètes

Les actinomycètes sont des bactérie à Gram positif (Williams et al., 1993, Sanglier et Trujillo, 1997) à GC % supérieur à 55% (Goodfelloow et Williams,1983) . Caractérisés par une croissance lente et souvent par une production important d'antibiotiques. Plusieurs d'entre eux produisent des spores non mobiles (*Streptosporangium*) (Locci et Sharples ,1984). La plupart sont aérobies et neutrophiles. Leur morphologie, cependant, varie entre les différents genres, de forme cocci (*Micrococcus*), bâtonnets (*Mycobacterium*) et polymorphes (*Nocardia*) jusqu'aux filaments ramifiés qui se décomposent en cellules sphériques ou qui donnent un mycélium aérien avec de longues chaines de spores (Erikson, 1949).

Ce sont des micro-organismes essentiellement telluriques qui sont distribués largement dans des écosystèmes naturels (Patil et al., 2011). Les actinomycètes isolés d'environnements marins sont métaboliquement actifs et se sont adaptés à la vie dans la mer, qui sont localisés en deux zones, la zone littorale et côtière et la zone des sédiments de fonds marins, ainsi a été constaté que la population d'actinobactéries et d'autres micro-organismes est plus dense dans les mers peu profondes (Weyland, 1969). Selon Ghanem et al., (2000) le nombre d'actinomycètes marins isolés de sédiments ont dépassé de loin ceux trouvés dans l'eau de mer, en plus ces sédiments sont le meilleur fournisseur de ces micro-organismes.

2. Taxonomie et classification des actinomycètes

Les caractéristiques morphologiques d'actinobacteries est une base importante pour la classification. Le développement et formation des quelques structures, comme mycélium aérien, spore, et sporange, sont affectées par les conditions de la culture (Qinyuan et al., 2016). La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques et chimiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires séparent les espèces (Badji, 2006).

2.1. Taxonomie

2.1.1. Critères morphologiques

Généralement sont basés sur :

- La couleur du mycélium aérien et/ou du substrat, ainsi que la production et la couleur des pigments solubles (Badji, 2006).
- La présence ou non d'un mycélium vrai.
- La production ou non d'un mycélium aérien.

- La fragmentation ou non du mycélium végétatif.

La production ou non de structures spéciales comme les sporanges, les sclérotés et les zoospores (Bergey's, 1989).

La figure 1 décrit des principaux types de structure de spore chez les streptomycètes.

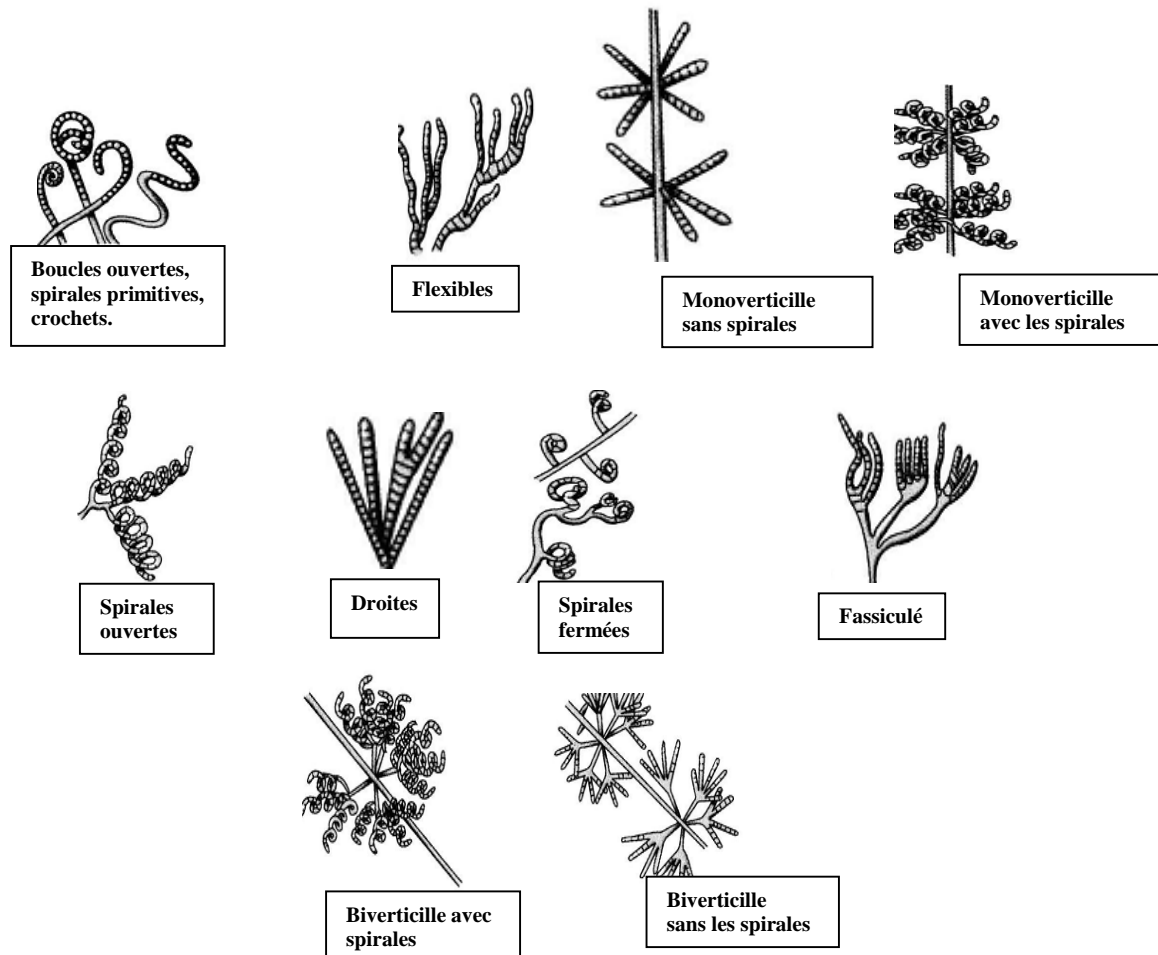


Figure 1 : Types de structure de la spore portée par les streptomycètes (Madigan et al., 1987).

2.1.2. Critères chimio-taxonomiques

La chimio-taxonomie a joué un rôle important dans la classification des actinomycètes. Elle consiste à étudier la composition chimique de la paroi cellulaire. Les actinomycètes ont été divisés en chimio types sur la base de l'analyse des acides aminés pariétaux comme: LL- DAP, Glycine (type I) et Lysine, acide Aspartique (Type VI) et des sucres cellulaires tell que : DL- DAP, Galactose (Type III) et DL-DAP, Arabinose, Galactose (Type IV) (Becker et al., 1965 ; Yamaguchi, 1965 ; Lechevalier, 1970).

2.1.3. Critères physiologiques et biochimiques

La caractérisation porte en particulier sur :

- La dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protidiques.
- La résistance à certains antimicrobiens et tolérance à des différentes valeurs de température, de pH, et de salinité (Lamari, 2006).

2.1.4. Critères moléculaires

Trois critères sont généralement étudiés :

- Séquençage de l'ADN ribosomique 16S (Stanckebrandt et al., 1997).
- Coefficient de Chargaff ou GC% (Stanckebrandt et al., 1981).
- Taux d'hybridation ADN/ADN (Wayne et al., 1987).

2.2. Classification

Selon le Bergey's manual, (2012), les actinomycètes sont classés dans le domaine Bactéria et phylum des Actinobacteria qui est subdivisé en 06 classes dont celle de Actinobacteria. Celle-ci se divise en 15 ordres. Les plus importants sont ceux des *Actinomycetales* et *Streptomycetales* (voir tableau 1). (Goodfellow et al., 2012).

Tableau 01: Classification des actinomycètes selon le "Bergey's Manual de Systematique Bactériologique, (2012)

Domaine	<i>Bactéria</i>					
Phylum	<i>Actinobacteria</i>					
Classe	<i>Nitriliruptoria</i>	<i>Acidimicrobiia</i>	<i>Actinobacteria</i>	<i>Rubrobacteria</i>	<i>Coriobacteria</i>	<i>Thermoleophilia</i>
Ordre	- <i>Actinomycetales</i> - <i>Streptomycetales</i> plus les 13 Ordres.					
Famille	<i>Actinomycetaceae</i>			<i>Streptomycetaceae</i>		
Genre	- <i>Actinomyces</i> plus les 6 autres genres			<i>Streptomyces</i> plus les 2 autres genres.		

3. L'intérêt des actinomycètes marin

3.1. Dans l'environnement et agriculture

Les actinomycètes sont des micro-organismes omniprésents dans le monde marin, et jouent un rôle écologique essentiel dans le recyclage de biomatériaux réfractaires et produisent des métabolites secondaires nouveaux (Hassan et al., 2017).

Les actinomycètes ont un rôle important dans l'environnement marin qui sont la source de la production d'antibiotiques (Donadio et al., 2010 ; Meena et al., 2013). Ils jouent un rôle considérable dans la minéralisation de la matière organique, l'immobilisation d'éléments nutritifs minéraux, la fixation d'azote, la solubilisation du phosphate et l'amélioration des paramètres physiques (Dastager et al., 2013).

3.2. Dans le domaine pharmaceutique

Plusieurs genres d'actinomycètes peuvent produire des métabolites secondaires (Manivasagan et al., 2013). En effet ils sont capables de synthétiser de nombreux produits naturels y compris les alcaloïdes, les peptides, les stéroïdes et autres. Ces produits naturels ont des potentialités de lutter contre certaines maladies majeures comme le cancer, le HIV, l'infections du protozoaires et d'inflammations sévères (Hassan et al., 2017). Ces microorganismes produisent aussi des antioxydants cytotoxiques, des agents anti-tumoraux, des agents immunosuppresseurs, cardio-vasculaire, des inhibiteurs d'enzymes et des pigments (Dharmaraj., 2010).

3.3. En biotechnologique

Les actinomycètes d'origine marine ont des caractéristiques physiologiques, biochimiques, moléculaire différentes des actinomycètes d'origine tellurique. Ils ont un potentiel pour produire une variété d'enzymes (Jenson et Lauro, 2008).

En effet, ils représentent l'un des groupes de micro-organismes connus pour la production de cellulases, de lipases qui est une enzyme qui possède plusieurs applications aussi bien dans l'agro-alimentaire que pharmaceutique (Schmid et Verger, 1998; Pandey et al., 2000). La production de chitinases par les actinomycètes a été rapportée par Hosney et al. (2010) qui sont des enzymes du complexe chitinolytique capable de dégrader directement la chitine en oligomère (chito-oligo-saccharides) et / ou en monomères (glucosamine N- acetyl). Selon Oskay et al. (2004) les actinomycètes produisent d'autres métabolites secondaire dotés d'une large gamme d'activités, telle que les vitamines (vitamines C, E, et A) (Dekkers et al. 1996; Kaczmariski et al. 1999), les herbicides, les pesticides, les antibiotiques (Pyridinium) (Dasari et

al. 2012), les antivirale (3-chloro-tetrahydroquinolone alcaloïde) (Lee et al., 2007) et antiparasitaire (valinomycine au depsipeptide cyclique) (Pimentel-Elardo et al., 2010).

4- Métabolites bioactifs produit par les actinomycètes

Les métabolites bioactifs sont des produits du métabolisme primaire et secondaire de différents organismes (plantes, animaux, champignons, bactéries) (Demain et Sanchez, 2009).

Les actinomycètes sont des groupes les plus effectifs producteurs de métabolites secondaires et sont très importants d'un point de vue industriel (Solanki , 2008) . Parmi ces métabolites secondaires on peut citer :

➤ Les antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules qui sélectivement inhibent la croissance bactérienne sans endommager les cellules d'eucaryotes. La sélectivité d'action de ces substances est donnée par le fait qu'ils perturbent la stabilité des eucaryotes. Les antibiotiques cible essentiellement des structures bactériennes ou des fonctions, telles que biosynthèse de paroi cellulaire (vancomycine), traduction (streptomycine), transcription de l'ARN (rifampicine), reproduction et synthèse de l'ADN (novobiocine et metronidazole), (Vitale et al., 2015).

Un grand nombre de molécules antibiotique ont été isolées à partir des actinomycètes d'origine marine (Sivakumar et al., 2007 et Das et el., 2008). Par exemple l'abyssomicine C qui est un nouvel antibiotique de la famille des polykétides produit par la souche *Verrucosipora* marine (Riedlinger et al., 2004), est un fort inhibiteur de l'acide para-aminobenzoïque par conséquence inhibe la biosynthèse de l'acide folique (Bister et al., 2004).

➤ Les enzymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les produits industriels les plus importants des actinomycètes (Theilleux, 1993). En effet, ce sont d'excellents producteurs d'enzymes à utilisation industrielle telle que des protéases, des chitinases (Tanaka et Omura, 1990 et Vonothini et al., 2008), des amylases, des cellulases, des xylanases et des lipases (Park et al., 2002).

➤ Les substances antioxydantes

Les antioxydants sont des substances capables de retarder ou d'inhiber l'oxydation, (Dekkers et al., 1996). Les actinomycètes d'origine marine sont des fournisseurs potentiels de métabolites bioactifs nouveaux et ont émergé actuellement comme une source importante pour les produits naturels avec leur diversité chimique unique (Mohankumar et al., 2012). Les actinomycètes isolés des sédiments marins peuvent être la source potentielle d'antioxydants avec des propriétés anticancéreuses (Nagaseshu et al., 2016). Arumugam et al., (2010); Shin et al. (2008) ont rapportés que le 2-allyoxyphenol et la streptopyrolidine possèdent une activité antioxydante et aucune activité cytotoxique parmi les composés isolés du genre *Streptomyces*.

➤ Les probiotiques

Le terme "probiotique" est un mot relativement nouveau qui signifie "en faveur de la vie" et qui est actuellement utilisé pour désigner des bactéries associées à des effets bénéfiques chez l'homme et les animaux (Metchnikoff, 1907). You et al. (2005) ont décrit le potentiel de *Streptomyces* contre le pathogène des crevettes *Vibrio spp.* et ont recommandé que les souches *Streptomyces* marines ont un potentiel probiotique en raison de leur capacité à dégrader les macromolécules comme l'amidon et des protéines en culture d'eau de l'étang, pour produire des agents antimicrobiens et à former des spores qui résistent à la chaleur et dessiccation.

Matériel & Méthodes

I. Matériel

1. Matériel analytique (voire annexe I)

2. Matériel biologique

2.1. Microorganisme test «souche d'actinomycète SR1»

La souche d'actinomycète d'origine marin nommée SR1 a été isolée par M^{me} BOUDRAHEM Daouia doctorante au sein du laboratoire de microbiologie appliquée (LMA), à partir d'un échantillon de sédiments marins prélevés d'un site du littoral de la côte Ouest de la wilaya de Bejaia.

2.2. Germes cibles

➤ **Bactéries à Gram négatif**

- *Escherichia coli* ATCC 25922.
- *Salmonella Typhi* (LMA).
- *Vibrio cholerae* (LMA).

➤ **Bactéries à Gram Positif**

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923.
- *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Remit par SAIDAL Antibiotical d'Alger).

➤ **Moisissures**

- *Aspergillus niger* 939N
- *Aspergillus faveus* (NRRL)
- *Aspergillus parasiticus* (CB5)

Les trois germes *d'aspergillus* sont fournis aimablement par l'ENS-Kouba, Alger.

II. Méthodes

1. Revivification de la souche d'actinomycète SR1

La souche SR1 est re-isolée sur le milieu SCA; additionné d'un antifongique ($K_2Cr_2O_7$ à 50µg/ml) pour inhiber la croissance des champignons filamenteux. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 30 jours.

2. Caractérisation de la souche d'actinomycète SR1

❖ L'étude macro-morphologique

Cette étude consiste à déterminer la forme et la taille des colonies; la couleur des mycéliums aériens (MA) et de substrat (MS), la production ainsi que la couleur des pigments solubles produits sur les différents milieux de culture préconisés par «l'international

Streptomyces project » (ISP1, ISP2, ISP3, ISP4, ISP7, ISP9) (Shirling et Gottlieb, 1966), et sur les milieux Glucose-Yeast Extract-Agar (GYEA), Gélouse Nutritive (GN), Mueller Hinton (MH), Gélouse à l'extrait de Malt (GEM), Oxytetracycline Glucose Agar (OGA), (Athalye et al., 1981) et Starch Casein Agar (SCA) (williams et kuster 1965). Les boîtes sont incubées à 28°C et les observations sont effectuées après 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours.

- La composition des ces milieux utilisés est donnée en annexe (III et II).

❖ L'étude micro-morphologique

Les colonies d'actinomycètes sont observées sur les différents milieux cités précédemment à l'aide d'un microscope optique à deux grossissements(X40 et X10) après 7 et 14 jours d'incubation. Cette étude consiste à voir les structures et la fragmentation ou non du mycélium du substrat (MS) et du mycélium aérien (MA), ainsi que la sporulation.

❖ L'étude physiologique

• Croissance à différentes concentrations de NaCl

La souche d'actinomycète est ensemencée sur milieu ISP2 gélosé à différentes concentration en NaCl qui sont 0 ; 3,5 et 6,5 % (m/v). Les cultures sont incubées à 28°C et la croissance est suivie par observation des colonies toutes les 24h (Athalye et al., 1985).

• Croissance à différentes valeurs de pH

Ce test est réalisé sur milieu ISP2 gélosé ajusté à différents pH (5, 7 et 9.5). La souche est ensemencée puis incubée à 28°C. La croissance est observée et notée après 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jours (Athalye et al., 1985).

• Croissance à différents températures

La souche d'actinomycète est ensemencée sur les milieux ISP2 (eau distillée 100%) et ISP2 (eau de mer 50%) qui sont incubée à différentes températures (4, 15, 28, 37,40 et 44°C). La croissance est suivie pendant 21 jours d'incubation.

• Sensibilité aux différents agents chimiques

Ce test est réalisé par l'ensemencement de la souche en stries sur le milieu GYEA préconisé par Athalye et al. (1985) additionné du composant des agents chimiques à tester suivant : Crystal violet (0,001%), Azide de sodium (0,001% et 0,01%) et Tellurite de potassium (0,01% et 0,05%). Les boîtes sont incubées 21 jours à 28°C.

• Sensibilité aux antibiotiques

La sensibilité aux antibiotiques est effectuée sur le milieu Muller Hinton (Athalye et al., 1985). Les disques d'antibiotiques sont déposés à l'aide d'une pince à la surface de la gélose qui est préalablement ensemencée en stries par la souche testée. Les boîtes sont incubées à 28°C pendant 7 à 14 jours. Les diamètres des zones d'inhibition obtenues autour des disques sont mesurés. Les charges d'antibiotiques testés, leurs abréviations, et leurs familles sont données dans le tableau 2.

Tableau 02 : Les antibiotiques testés à l'égard de la souche d'actinomycètes.

Antibiotiques	Charge (µg)	La famille
Rifampin(REF)	5	Rifamycines
Vancomycine (VA ³⁰)	30	Glycopeptides
Chloramphénicol (C)	30	Phénicolés
Acide Fusidique (FA ¹⁰)	10	Fusidanines
Streptom (S)	10	Streptomycines
Néomycine	30	Aminosides

❖ L'étude biochimique

• Hydrolyse de l'amidon

Selon la méthode de Marchal et al. (1991) le test de l'hydrolyse de l'amidon est réalisé sur la gélose nutritive contenant 10% (m/v) d'amidon soluble. Après incubation à 28°C pendant 14 jours, la gélose est recouverte d'une solution de Lugol. L'absence de l'apparition des zones claires autour des colonies indique l'hydrolyse de l'amidon, par contre les zones contenant de l'amidon se colorent en brun.

• Dégradation de la gélatine

Le test d'hydrolyse de la gélatine est réalisé sur la gélose nutritive contenant 0,4% (m/v) de gélatine. Après ensemencement de la souche SR1, les boîtes sont incubées à 28°C pendant 14 jours. La révélation de la dégradation est effectuée avec une solution de chlorure mercurique à 15% (m/v). Les zones claires correspondent aux zones d'hydrolyse de la gélatine (Williams et Cross, 1971).

• Dégradation de la tyrosine

La dégradation de la tyrosine est réalisée selon la méthode préconisée par Gordon et al, (1974). Les 100 ml de gélose nutritive sont complétée par une suspension de 0,4 g de tyrosine

qui est solubilisé dans 10 ml d'eau distillée puis stérilisé à l'autoclave (120°C pendant 20 min). Les boîtes ensemencées sont incubées à 28°C, la lecture est effectuée après le 7^{ème}, 14^{ème} et 21^{ème} jour, et se traduit par l'apparition des zones claires, correspondent aux zones d'hydrolyse de la tyrosine.

- **Dégradation du Tween 80**

Sur milieu contenant du Tween 80 la souche d'actinomycète est ensemencée en spots. La lecture est effectuée après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 28°C. La dégradation du Tween 80 traduit par l'apparition d'une auréole opaque autour des colonies (Sierra, 1957).

- **Utilisation des composés glucidiques comme seule source de carbone**

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence de composés glucidiques en utilisant le milieu ISP9 préconisé par (Pridham et Gottlieb, 1948). Les glucides testés comme seule source de carbone sont les tests suivants : sucrose, L- arabinose, D -mannitol, D+xylose, D- glucose, lactose, D+saccharose, fructose, D+cellobiose, D- mannose, D- sorbitol. Après ensemencement sur les tubes et l'incubation pendant 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les tubes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celles obtenues sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif) et sur ISP9 contenant le glucose (témoin positif).

- **Utilisation des acides aminés comme seule source de carbone**

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence des acides aminés en utilisant le milieu ISP9 préconisé par (Pridham et Gottlieb, 1948). Les acides aminés testés comme seule source de carbone sont les tests suivants: cystéine, tyrosine, L- lysine, L-arginine, glycine, L-leucine, L-tryptophane, L- glutamine et L-méthionine. Après ensemencement sur les tubes et incubation pendant 3 semaines à 28°C, la croissance est estimée sur les tubes contenant les différentes sources de carbone par rapport à celle obtenue sur ISP9 sans source de carbone (témoin négatif).

- **Utilisation des sels de sodium comme seule source de carbone**

Ce test consiste à apprécier la croissance de l'actinomycète en présence des sels de sodium comme seule source de carbone. Les sels de sodium testés sont les tests suivants : acétate de sodium, citrate de sodium, oxalate de sodium, tartrate de sodium et potassium, propionate de sodium. Après ensemencement sur les tubes et incubation pendant 3 semaines à 28°C, la dégradation de ces sels est notée positivement après virage de l'indicateur coloré (rouge de phénol) du jaune au rouge-rose (Gordon et al, 1974).

- **La production de pigments mélanoides**

La mise en évidence de la production de pigments mélanoides par la souche SR1 est réalisée sur milieu gélosé ISP7 (Shirling et Gottlieb, 1966). La souche SR1 estensemencée en touche à la surface de la gélose et incubée à 28°C. L'observation est effectuée quotidiennement après le troisième jour.

- **Production de nitrate réductase**

Le test de nitrate réductase est effectué sur bouillon nitraté (Marchal et al., 1991). La réduction des nitrates est constatée par la mise en évidence des nitrites formés à l'aide de deux réactifs NR1 et NR2. Après 7 à 10 jours d'incubation, le test positif se manifeste par l'apparition de couleur rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés s'il ya :

- Apparition de la couleur rouge : les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche.
- Absence de coloration : les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites.

- **Recherche de la catalase**

Ce test est réalisé selon la méthode sur lame. La colonie est dissociée dans une goutte de peroxyde d'hydrogène 30% (v/v), sur une lame d'observation microscopique. La présence d'une catalase se caractérise par la formation immédiate de bulles d'oxygène tel que rapporté par Kitouni (2005).

La composition chimique des milieux de culture utilisés pour l'étude biochimique est donnée en Annexe III.

3. Mise en évidence des activités antibactériennes et antifongiques

❖ Standardisation des inocula bactériens

Après leurs revivifications, une culture de 18h dans des tubes de 5ml de bouillon nutritif incubée à 37°C à été réalisée pour chacune des bactéries cibles. Ces cultures sont considérées comme des suspensions mères. Une série de dilutions décimales est réalisée est les bactéries sont dénombrées sur deux boites de milieu GN. L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24h. A l'aide d'un spectrophotomètre (spectrophotomètre Shimadzu UV mini.1240), les valeurs d'absorbances correspondantes aux dilutions présentant. Nombre de 10^6 UFC/ml (figure 09 et 10, annexe VI) ont été retenus pour préparer des cultures de 18h qui ont servi pour le test d'activité antibiotique (Billerbeck et al., 2002).

3. 1. Test d'antagonisme par la méthode des cylindres d'agar

3.1.1. L'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de la souche SR1 est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Mueller Hinton. Selon Bastide et al., (1986), qui consiste à ensemencer la souche SR1 sur les deux milieux étudiés (SCA et ISP2) et incubé pendant 5 jours à 28°C, des disques d'agar de 6mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un embout stérile à partir des deux milieux cités plus haut puis déposer à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage avec les germes cible, les boîtes sont par la suite mises à 4°C pendant 2h pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, et enfin incubées à 37°C pendant 24h.

Les lectures sont effectuées par mesure du diamètre des zones d'inhibition autour des cylindres.

La figure 2 ci dessous résume les étapes suivies.

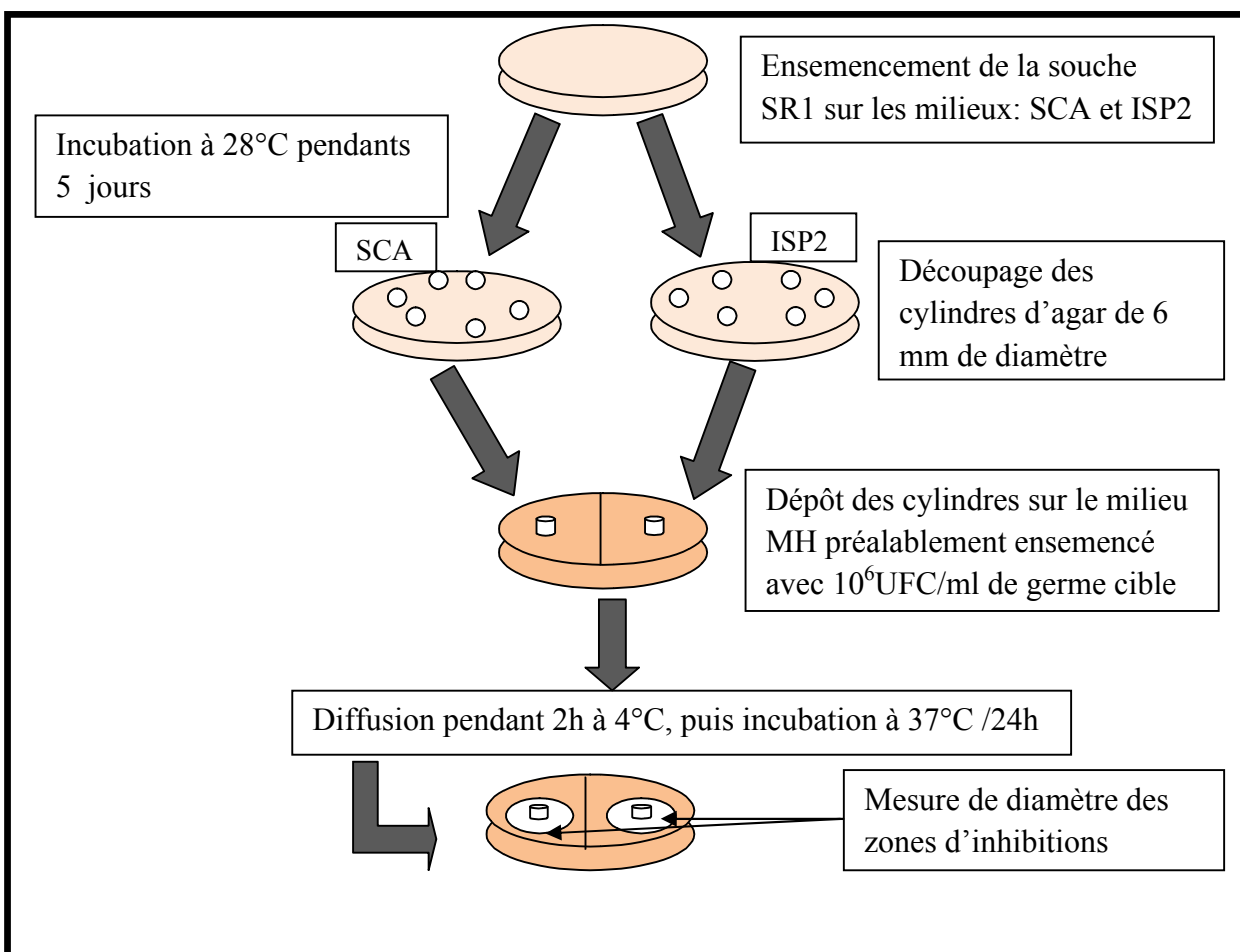


Figure 2 : Mise en évidence de l'activité d'antibiotique de l'isolat d'actinomycète SR1 sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar (Bastide et al., 1986).

❖ Standardisation des inocula de moisissures

Les suspensions sporales des moisissures de 10^5 spore/ml dans l'eau physiologique utilisées pour le test d'activité antifongique ont été préparées suite à leurs dénombrement sur cellule de Malassez (Matan, 2008).

3.1.2. Evaluation de l'activité antifongique

L'activité antifongique de la souche est évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur la gélose à l'extrait de malt, selon Patel et Brown, (1969). Ce test est réalisé de la même façon que pour le test précédent (activité antibactérienne), en utilisant des suspensions sporales (10^5 spore/ml) (Matan, 2008). À partir des milieux ISP2 (08^{ème} jour), ISP2 (13^{ème} jour) et SCA (13^{ème} jour), les disques d'agar sont déposés sur la surface de milieu gélose à l'extrait de Malt. Les boîtes ensemencées ont été incubées à 28°C et les zones d'inhibition ont été mesurées après 48h d'incubation.

3.2. Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des puits

Afin de mettre en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des puits, des pré-cultures de 5 ml sur les milieux SCA et ISP2 liquide de cette souche servent pour ensemencer des cultures de 50 ml des mêmes milieux contenus dans des flacons de 250 ml. Les flacons sont incubés à 28°C sous agitation à 250 rpm pendant 5 jours (Poosarla et al., 2013).

L'activité antibiotique et antifongique est déterminée par la méthode des puits (Nouasri, 1996). En utilisant le milieu Mueller Hinton et gélose à l'extrait de malt préalablement tapissés par une goutte de gélose blanche et ensemencés avec le germe cible (10^6 UFC/ml) pour la bactérie et (10^5 spores /ml) pour les moisissures. Après décantation des flacons précédents, une quantité de 50µl de chaque surnageant de culture est prélevé stérilement avec une micropipette, puis introduit dans les puits par ordre des jours de prélèvement (5^{ème}, 7^{ème} et 9^{ème} jours). Les boîtes sont ensuite mises à 4°C pendant 2h afin de permettre une diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes cibles, puis incubées à 37°C pour les bactéries et à 28°C pour les moisissures. La lecture des résultats s'effectue en mesurant le diamètre des zones d'inhibitions autour des puits après 24h pour les bactéries et 48h pour les moisissures. En utilisant un pied - à - coulisse.

4. Choix du meilleur milieu de production d'antibiotiques

Afin de déterminer le meilleur milieu de production d'antibiotiques, nous avons repiqué la souche SR1 sur deux milieux différents : SCA et ISP2 dont la composition est mentionnée en annexes (II et III). Après cinq jours d'incubation à 28°C, un test d'activité antimicrobienne et antifongique est réalisé par les méthodes des cylindres d'agar et des puits vis-à-vis, des germes cibles préalablement cités (2-2).

Le meilleur milieu de production d'antibiotiques sera celui qui remis l'obtention des diamètres des zones d'inhibitions les plus importants.

5. Mise en évidence de l'activité enzymatique

La souche étudiée à été également testée pour sont potentiel enzymatiques :

❖ **Activité cellulasique**

Les cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un embout à partir de milieu SCA et ISP2 puis déposer à la surface du milieu de culture contenant du Carboxyl Methyl Cellulose (CMC) comme seule source de carbone. Après l'incubation des boites, la révélation de l'activité CMC_{Case} est effectué avec une solution de rouge Congo à 0,1% (m/v) pendant 20 min suivi de lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min après 3,5 et 7 jours d'incubation (Ninranjane et al., 2007). L'hydrolyse de la CMC est traduite par l'observation des halos orange clairs autour des cylindres sur un fond rouge.

❖ **Activité xylanasiqque**

Les cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un embout à partir de milieu SCA et ISP2 puis déposer à la surface du milieu de culture contenant du xylane (xylane de maïs et xylane de bouleau) comme seule source de carbone (Viet, 1991). Après l'incubation des boites, la révélation de l'activité xylanase est effectuée avec le n-butanol pendant 20 min suivi de lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min après 3,5 et 7 jours d'incubation (Teather, 1982). L'hydrolyse du xylane est traduite par l'observation des halos clairs autour des cylindres sur un fond marron.

❖ **Activité L-asparaginase**

Les cylindres d'agar de 6 mm de diamètre sont découpés stérilement à l'aide d'un embout à partir de milieu SCA et ISP2 puis déposer à la surface du milieu contenant la L- asparagine comme seule source de carbone. Les boites sont incubées à 28 °C pendant 3,5 et 7 jours. La présence d'asparaginase se traduit par le virage de la couleur de milieu de culture de marron clair au rose suite à l'alcalinisation de ce dernier.

❖ **Activité chitinasique**

L'ensemencement par touches est réalisé à partir de milieu SCA et ISP2 sur milieu contenant la chitine comme seule source de carbone puis les boîtes sont incubées à 28°C pendant 3,5 et 7 jours. La présence de chitinase se traduit par l'observation des halos clairs autour des colonies.

– La composition chimique des milieux de cultures utilisés pour les tests d'activité enzymatique est donnée en annexe II.

6. Mise en évidence de l'activité antibiofilm de la souche SR1

6.1. Ensemencement de la microplaque

La formation de biofilms est testée sur des microplaques en polystyrène suivant le protocole de (O'Toole et al., 1999), avec quelques modifications.

Ensemencés les trois premiers puits de la microplaque, préalablement remplis avec 100 µl de bouillon nutritif, avec 50 µl d'une suspension bactérienne fraîche de 18h à 10^8 UFC/ml ; et additionnée 50µl de surnageant dans les trois puits qui restent.

La microplaque est incubée à 30°C pendant 24h. Six puits contenant 200 µl de bouillon stérile sont utilisés comme témoins.

6.2. Coloration au cristal violet (0,1%)

Après incubation, les suspensions bactériennes, dans les puits, sont aspirées puis rincées deux fois avec 200 µl de l'eau physiologie.

Les cellules adhérentes microplaque sont fixées avec 200 µl d'éthanol à 96% pendant 15 minutes, puis l'éthanol est aspiré et les puits sont laissés sécher stérilement.

Les cellules fixées sont colorées avec 200 µl d'une solution de cristal violet à 0,1% (w/v) pendant 20 min, puis lavées avec 200 µl de l'eau physiologie jusqu'à obtention d'une couleur claire du liquide de lavage.

–Le colorant fixé aux cellules est solubilisé en ajoutant 200 µl d'éthanol.

–La quantité de cellules fixées est estimée par la mesure de l'absorbance à 630 nm avec un lecteur de microplaque.

7. Mise en évidence de l'activité antioxydante

7.1. Dosage des polyphénols

Le réactif est constitué d'un mélange d'acide phosphotungstique ($H_3PW_{12}O_{40}$) et d'acide phosphomolybdique ($H_3PMO_{12}O_{40}$) de coloration jaune. Il est réduit lorsque les phénols sont oxydés, en un mélange d'oxydes bleus de tungstène et de molybdène (Ribéreau-Gayon, 1968). La coloration bleu produite a une absorbance maximale à environ 760 nm, et est proportionnelle à la quantité de polyphénols présents dans les surnagants.

La détermination des phénols totaux a été réalisée selon la méthode de Folin-Ciocalteu (Kähkönen et al., 1999). A chaque 200 μ l de surnagent, on ajoute 1 ml de solution de Folin-Ciocalteu, et 0,8 ml d'une solution de Carbonate de Sodium (7,5%). Après 15 minutes d'incubation à 50 ° C, l'absorbance est lue à 760 nm. L'absorbance de surnagent a été comparée à une courbe standard d'acide gallique pour estimer la concentration de polyphénols totaux dans l'échantillon. La teneur en polyphénols totaux a été exprimée en mg d'équivalents d'acide gallique (GAE) par ml d'extrait.

7.2. Evaluation de l'activité antioxydant par le diphenyle-picryl-hydrazyl (DPPH)

Dans ce test, les antioxydants réduisent le diphenyl-1-picrylhydrazyle violet en un composé de couleur jaune, le diphenyl-1-picrylhydrazine, dont l'intensité de couleur est inversement proportionnelle à la capacité des antioxydants présents dans le milieu réactionnel (Sanchez-Moreno, 2002). La capacité de surnagent à éliminer le radical DPPH a été déterminée selon le procédé de Brand-Williams et al., (1995) avec quelques modifications : 50 μ l de surnagent ont été ajoutés à 2 ml de solution méthanolique de DPPH à 0,004%. Le mélange a été agité vigoureusement et laissé au repos à température ambiante dans l'obscurité pendant 30 minutes. L'absorbance a été mesurée à 517 nm, et l'activité a été exprimée en utilisant l'équation suivante: % DPPH inhibition = $\frac{AB - AA}{AB} \times 100$

AB: Absorbance de la solution de DPPH à t = 0.

AA: Absorbance en présence de surnagent ou du standard après 30 min.

Résultats
Et
Discussion

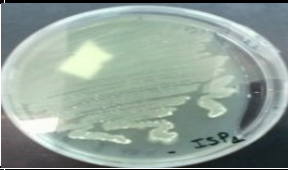
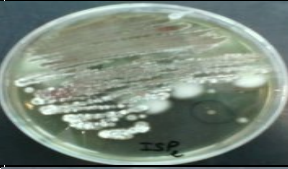

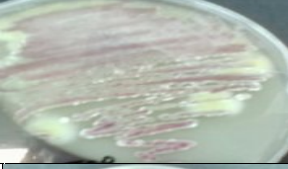

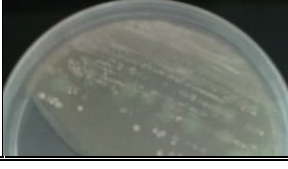
Dans cette partie sont présentés les résultats et les discussions de la caractérisation d'une souche d'actinomycète d'origine marin SR1, suivi d'une mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique de cette souche par les méthodes des disques d'agar et des puits, ainsi que son activité enzymatique sur milieu solide. Nous allons également présenter les résultats d'aptitude à former des antibiofilms et le pouvoir antioxydant de métabolites produit par cette souche.

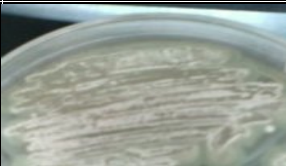



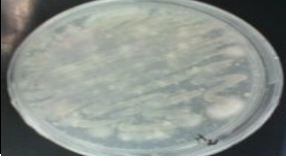
1. Caractérisation de la souche d'actinomycète SR1

❖ Etude macromorphologique

La description de l'ensemble des résultats de l'étude macromorphologique de la souche SR1 et cultivée sur différents milieux est rapportée dans le tableau 03.

Tableau 03 : Croissance de la souche SR1 sur différents milieux de culture après 7 jours.

Milieu de Culture	Croissance	Sporulation	La couleur de mycélium aérien	La couleur de mycélium de substrat	Production de pigments diffusibles	Image
ISP1	++	+	Blanc	Beige	-	
ISP2	+++	+	Gris	Marron	-	
ISP3	+	+	Gris	Beige	-	
ISP4	+++	+	Blanc	Violet claire	-	
ISP7	+++	+++	Blanc	Marron	-	
ISP9	++	++	Blanc	Marron	-	

Milieu de Culture	Croissance	Sporulation	La couleur de mycélium aérien	La couleur de mycélium de substrat	Production de pigments diffusibles	Image
GYEA	+++	+	Blanc	Beige	-	
MH	-	-	-	Jaune	-	
GN	++	+	Blanc	Jaune	-	
OGA	++	+	Blanc	Beige	-	
SCA	+	+	Blanc	Beige	-	

Note : +++ : Croissance abondante ; ++: Bonne croissance ; + : Croissance faible ; - : Croissance nulle.

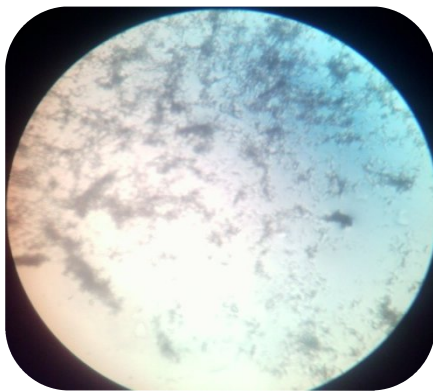
D'après ce qui précède nous pouvons déduire que :

La souche SR1 présente une croissance abondante sur les milieux ISP2, ISP4, ISP7 et GYEA, bonne sur les milieux OGA, GN, ISP9 et ISP1 mais elle est faible sur les milieux SCA et ISP3 alors que est nulle sur le milieu MH. La sporulation est abondante sur le milieu ISP7 et faible sur les milieux GN, OGA, SCA, GYEA, ISP4, ISP1 et ISP2, par contre elle est plus faible sur milieu MH. Aouiche et al., (2012) et Smaoui et al., (2012) ont trouvés une bonne croissance et une sporulation abondante sur les milieux ISP2, ISP3 et ISP4. La couleur du mycélium végétatif est globalement beige et celle du mycélium aérien est généralement blanche. Badji et al., (2007) ont obtenu une couleur blanchâtre pour le mycélium aérien et jaune pour le mycélium substrat.

La souche SR1 ne produit pas de pigment diffusible sur tous les milieux précédemment cités.

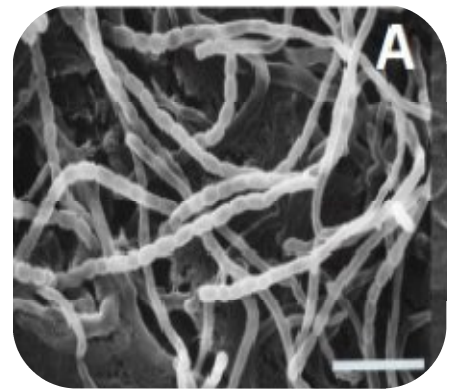
❖ Etude micromorphologique

La figure 03 présente les photographies l'observation de la souche SR1 sur les milieux ISP2 et ISP4 sous microscope optique au grossissement (x40) après 14 jours d'incubation à 28°C. Les filaments des mycéliums aériens de la souche SR1 sont fragmentés, non cloisonnés portant des chaînes de spores du type RF (rectus-flexibilis) avec une forme droites sur milieu ISP2 et RA (retinaculum) avec une forme spiralée sur milieu ISP4, ce type de mycélium est caractéristique du genre *Streptomyces*.

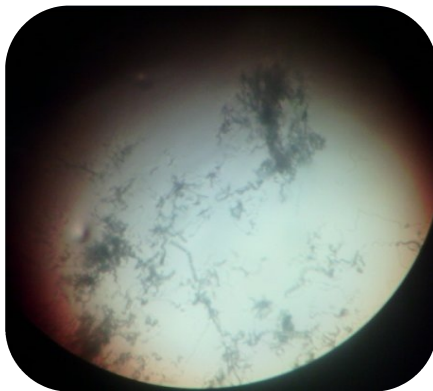


Chaines de spores de type
Rectus-Flexibilis sur milieu ISP2

Semblable à A

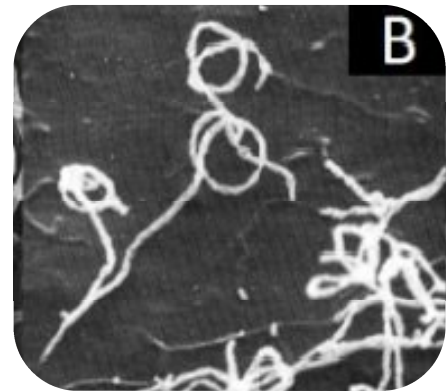


La chaîne de spore du type de
Rectus-Flexibilis de *Streptomyces
actuosus* U 227 (par T.Mikawa et
R.Sashida)



Chaines de spores de type
Retinaculum sur le milieu ISP4

Semblable à B



La chaîne de spore du type
retinaculum de *Streptomyces
vinaceus*

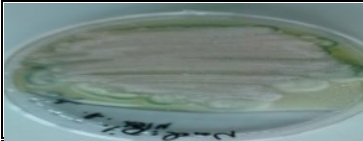
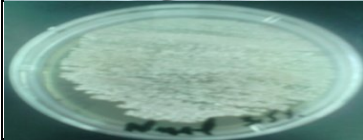
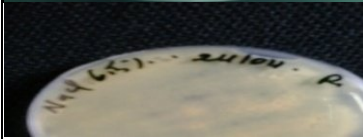
Figure 03: Observation sous microscope optique au grossissement (Gx40) des mycéliums aériens de la souche d'actinomycète SR1 cultivée pendant 14 jours sur les milieux ISP2 et ISP4.

❖ Etude physiologique

• Croissance à différents concentrations de NaCl

Le tableau 4 illustre les résultats de croissance de la souche SR1 à différentes concentrations de NaCl où on a noté qu'elles peuvent croître dans le milieu contenant 0% et 3,5% de NaCl. Les concentrations supérieures à 3,5% ne permettent pas leur croissance.

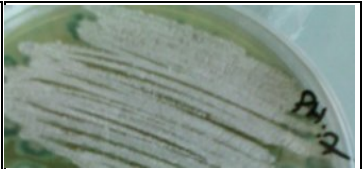
Tableau 04 : Croissance de la souche SR1 à différentes concentrations de NaCl toutes les 24h.

Période de lecture	Concentrations de NaCl	Résultats	Image
Toutes les 24h/21jours	0%	+	
	3,5%	+	
	6,5%	-	

• Croissance à différentes valeurs de pH

Concernant le pH (tableau 05), cette souche semble croître facilement à pH 7 mais elle ne pousse pas aux pH 5 et 9,5. Boubetra et al., (2013) ont aussi signalé l'absence de croissance de leur souche à pH 5.


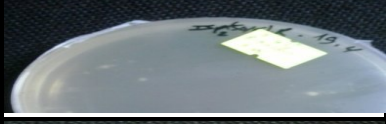

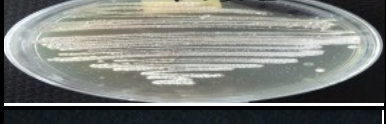


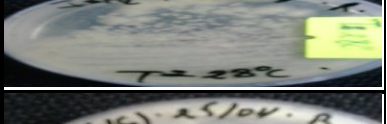

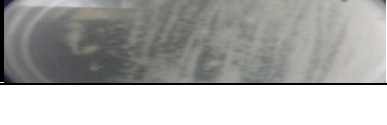
Tableau 05 : Croissance de la souche SR1 à différentes valeur de pH après 7 jours

Période de lecture	Croissance à différents Ph	Résultat	Image
7 ^{ème} jour	7	+	
	5	-	ND
	9,5	-	ND

• Croissance à différents températures

D'après le tableau 06 qui présente la croissance de la souche à différent température, on constate que celle-ci ne pousse pas aux températures de 4°C, 15°C, 40°C et 44°C par contre une croissance plus importante a température 28°C, mais toutefois avec un optimum de croissance à 37°C. Les résultats de Boubetra et al., (2013), Aouiche et al.,(2012) et Boudjella et al.,(2006) avec des températures 28°C, 30°C et 37°C semblent corroborer les notes.






Tableau 06 : Croissance de la souche SR1 à différentes températures après 21 jours d'incubation

Période de lecture	Température de croissance	Résultats	Image
21 ^{ème} jour	4°C (milieu ISP2)	-	
	4°C (milieu ISP2 50% eau de mer)	-	
	37°C (milieu ISP2)	+++	
	37°C (milieu ISP2 50% eau de mer)	+++	
	44°C (milieu ISP2 50% eau de mer)	-	
	40°C (milieu ISP2)	-	
	28°C (milieu ISP2)	+	
	15°C (milieu ISP2 50% eau de mer)	-	
	15°C (milieu ISP2)	-	

- **Sensibilité aux différents agents chimiques**

D'après les résultats de tableau 07 la souche est sensible à l'agent chimique Tellurite de potassium (0,01%) et à (0,05%), mais par contre elle est résistante à l'azide de sodium à (0,001%) et à (0,01%) et Cristal violet (0,001%).

Tableau 07 : Résistance ou la sensibilité de la souche SR1 aux différents agents chimiques après 21 jours.

Période de lecture	21 ^{ème} jour				
Résistance ou la sensibilité aux différents agents chimiques	Tellurite de potassium (0,01%)	Tellurite de potassium (0,05%)	Azide de sodium (0,001%)	Azide de sodium (0,01%)	Cristal violet (0,001%)
Résultats	+	+	-	-	-
Images					

- **Sensibilité aux antibiotiques**

Tableau 08 : Résistance ou la sensibilité de la souche SR1 à différents antibiotiques après 7 et 14 jours

Période de lecture	Antibiotiques	Résistance ou Sensibilité aux antibiotiques	Diamètre d'inhibition (mm)	Période de lecture	Résistance ou sensibilité aux antibiotiques	Diamètre d'inhibition (mm)
7 ^{ème} jour	Rifampin (REF)	R	/	14 ^{ème} jour	R	/
	Vancomycine (VA ³⁰)	S	27		S	27
	Chloramphénicol (C)	I	15		R	/
	Acide Fusidique (FA ¹⁰)	I	12		R	/
	Streptom (S)	I	15		I	15
	Néomycine (NEO)	S	25		S	25

Résistance (R) < 12 ; Intermédiaire (I) entre 12 à 18 ; Sensibilité (S) > 18.

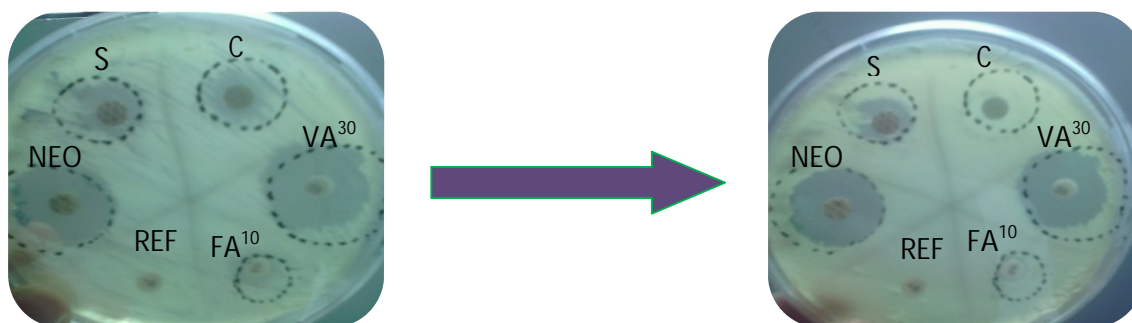


Figure 04 : Photographie illustrant le test d'antibiogramme de la souche SR1 après 14 jours d'incubation.

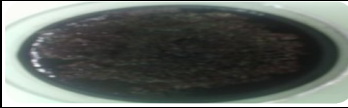
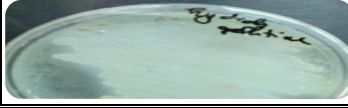


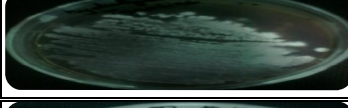
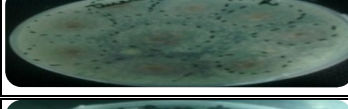
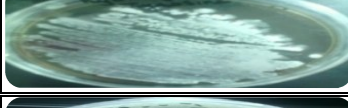

Après 7 et 14 jours d'incubation la souche montre une résistance à la Rifampine (REF) donc c'est possible qu'elle soit capable de produire cet antibiotique. Une sensibilité intermédiaire de la souche est notée vis-à-vis de l'acide fusidique (FA¹⁰), du Chloramphénicol(C) et du Streptom (S) pendant les 7 premiers jours, mais après 14^{ème} jour d'incubation la souche devient résistante à ces antibiotiques sauf vis-à-vis du Streptom (S) qui reste stable, cela veut dire que ces antibiotiques inhibent la croissance de la souche. La souche présente une sensibilité à la Vancomycine (VA³⁰) et à la Néomycine avec des diamètres respectifs de 27 et 25 mm ces antibiotiques ont un effet bactéricide sur la souche.

❖ Etude biochimique

• Hydrolyse des macromolécules

L'étude de la dégradation de quelque macromolécules a montré que la souche SR1 n'est pas capable de dégrader l'amidon mais elle est capable d'hydrolyser d'autres macromolécules telles que la gélatine, la tyrosine et le tween 80 (voir le tableau 09). Toutefois Smaoui et al., (2012) et Boudjella et al., (2006) ont trouvé que le tween 80 n'est pas dégradé par la souche *Streptomyces sp* TN256.

Tableau 09 : Test d'hydrolyse des macromolécules par la souche SR1.

Période de lecture	Hydrolyse de macromolécules	Résultats	Images
14 ^{ème} jour	Amidon	-	
	Gélatine	+	
7 ^{ème} jour	Tyrosine	+	
	Tween 80	+	
14 ^{ème} jour	Tyrosine	+	
	Tween 80	+	
21 ^{ème} jour	Tyrosine	+	
	Tween 80	+	

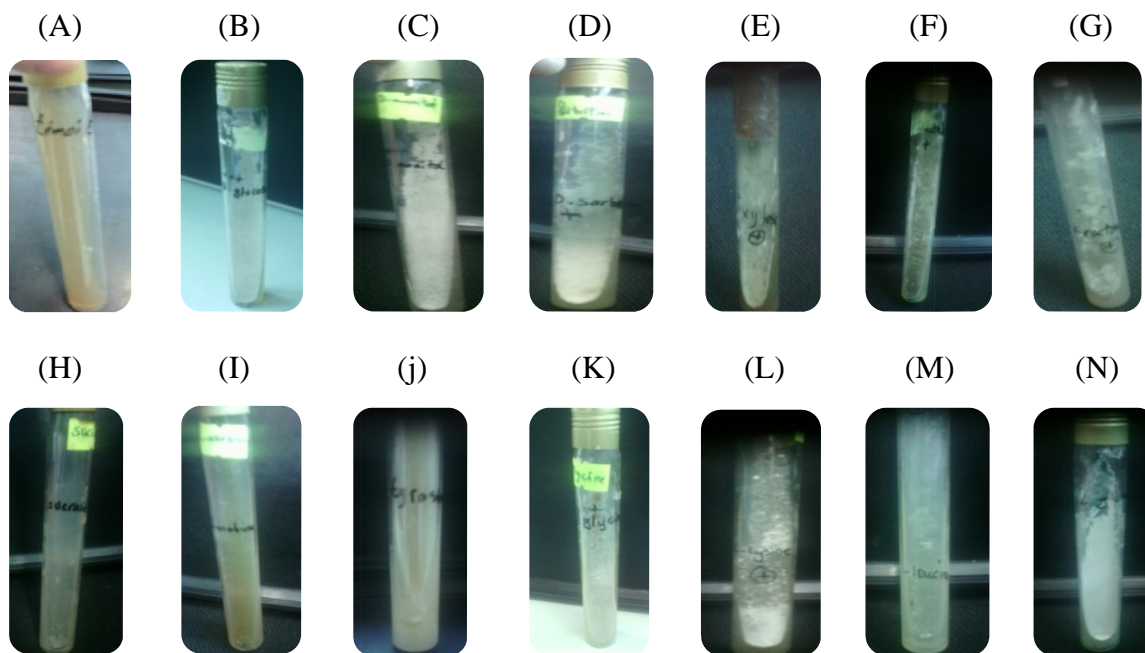
- **Utilisation des sucres et des acides aminés comme seule source de carbone**

Après trois semaines d'incubation à 28°C les résultats qui sont présentés dans le tableau 10 et la figure 07 montrent que la souche peut utiliser différents types de sucres comme seules sources de carbone notamment le D-mannitol, le D+ sorbitol et le D+xylose qui donnent une très bonne croissance par rapport au fructose, au lactose, au sucrose, au D+Glucose et au L- arabinose où la croissance est plutôt moyenne, tandis que le D+ saccharose, D+cellobiose et D- mannose ne sont pas assimilés par la souche. Kitouni, (2007) a signalé aussi que le saccharose n'est pas dégradé par *Streptomyces SS4* mais les études de Kokare et al., (2004) sur 20 actinomycètes marin ont montré une résultat positif sur arabinose, saccharose, xylose, inositol, mannitol, fructose, rhamnose et raffinose.

La souche SR1 est capable d'utiliser la plupart des acides aminés testés à l'exception de L-méthionine, L- tryptophane et L- arginine.

Tableau 10 : Dégradation des sucres et des acides aminés par la souche SR1 après 21 jours.






Dégradation des Sucres	Résultats	Dégradation des acides aminés	Résultats
Témoin sans sucre (A)	-	Témoin sans acide aminée	-
D+glucose (B)	+	Tyrosine (J)	+
D-mannitol (C)	+++	Glycine (K)	+
D+sorbitol (D)	+++	L- lysine (L)	+
D+xylose (E)	+++	L- leucine (M)	+
Lactose (F)	+	L- glutamine (N)	+++
Fructose (G)	+	L -méthionine	-
Sucrose (H)	+	L- tryptophane	-
L- arabinose (I)	+	L- arginine	-
D+saccharose	-	/	
D+cellobiose	-		
D- mannose	-		

**Figure 05** : photographie illustrant la dégradation quelques sucres et acides aminés par la souche SR1.

- **Utilisation des sels de sodium comme seule source de carbone**

Le propionate de sodium est le seul sel qui est dégradé par la souche SR1.

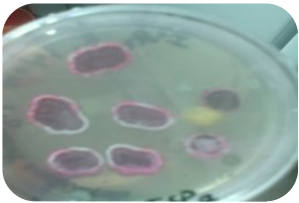
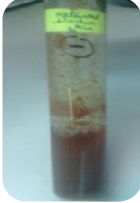

Tableau 11: Décarboxylation des sels de sodium par la souche SR1 après 21 jours.

Période	Décarboxylation des sels de sodium	Résultats
21^{ème} jour	Tartrate de sodium et potassium (A)	–
	Citrate de sodium (B)	–
	Oxalate de sodium (C)	–
	Propionate de sodium (D)	+
	Acétate de sodium (E)	–
Images	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">(A) </div> <div style="text-align: center;">(B) </div> <div style="text-align: center;">(C) </div> <div style="text-align: center;">(D) </div> <div style="text-align: center;">(E) </div> </div>	

- **Production de pigments mélanoides, de nitrate réductase et recherche de catalase**

Le tableau 12 résume les résultats sur la production de pigments mélanoides par la souche, ainsi que la production de nitrate réductase et la catalase qui sont négatifs. Margalith (1992) et Mizukami et al.,(2000) ont rapporté que les pigments bruns noirs sont produits par les actinomycètes dans le milieu ISP6 sans donner de résultats positifs, dans le milieu ISP7 mais ce n'est pas de la mélanine, mais des pigments voisins. Par contre, Shirling et Gottlieb (1966) les considèrent comme des pigments mélanoides.

Tableau 12 : Résultats des testes de production de pigments mélanoïdes, de la nitrate réductase et la recherche de catalase.

	Production de pigments mélanoïdes	Production de nitrate réductase	Recherche de catalase
Résultats	+	-	-
Images			

Remarque :

Les résultats de l'étude macromorphologique de la souche SR1 et leur croissance à différents valeurs de pH obtenus pendant le 14^{ème} et 21^{ème} jours sont présenté dans les tableaux 09 et 10 (annexe V).

D'après les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques réalisés, notre souche isolé à partir du sédiment marin possède les caractéristiques du genre *Streptomyces*.

2. Mise en évidence des activités antibactérienne et antifongique

2. 1. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne est mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar qui permet de détecter l'effet inhibiteur de la souche SR1 envers les germes cibles testés (Gram positives et Gram négatives). Ce test est réalisé sur milieu Muller-Hinton après 24 h d'incubation à 37 °C. Aucune zone d'inhibition n'est observée autour des cylindres, cela veut dire l'absence de l'activité antibactérienne vis-à-vis de tous les germes cibles testés. Ces résultats ne sont pas en accord avec de Kokare et al.,(2004) et Sirisha et al.,(2013) qui ont rapporté une activité a l'accord eux de *S.aureus*.

L'activité antimicrobienne est aussi mise en évidence par la méthode des puits avec des prélèvements effectués au 5^{ème}, 7^{ème}, et 9^{ème} jours sur milieu Muller Hinton à l'égard les germes cibles testés, après 24 h d'incubation à 37 °C, aucune zone d'inhibition a été notée autour des puits.

Les résultats des activités antimicrobiennes obtenus par les deux méthodes sont résumies dons le tableau 20 (annexe VI). Srivibool et Sukchotiratana, (2006) expliquent que l'absence de l'activité antibiotique vis-à-vis des bactéries à Gram négatif ne signifie pas forcément que la

substance est absente ou pas assez active, mais cela peut être dû à une mauvaise diffusion de celle-ci dans le milieu car n'étant pas polaire ou bien constituée de composés non polaires.

2. 2. Mise en évidence de l'activité antifongique

Concernant l'activité antifongique mise en évidence contre *Asp. niger*, *Asp. flavus* et *Asp. parasiticus* sur la gélose à l'extrait de malt par la méthode des cylindres d'agar, Après 48 h d'incubation à 28 °C, la souche SR1 ne présente aucune activité contre *Asp. flavus*, *Asp. parasiticus* et *Asp. niger*. Manivasagan et al., (2009) rapporté une activité anti fongique modérée contre les espèces d'*Aspergillus* par une souche de *Streptomyces PM-32* isolé à partir d'un sédiments marins.

Les résultats de la mise en évidence de l'activité antifongique par la méthode des puits est noté négatif contre *Asp. flavus* et *Asp. parasiticus* après 5^{ème}, 7^{ème}, et 9^{ème} jours de prélèvement, par contre les résultats sont positifs vis-a-vis *Asp. niger* avec un diamètre de zone d'inhibition de 23 mm à partir de milieu SCA et 15 mm à partir de milieu ISP2 après le 7^{ème} jour.

Du test d'antagonisme obtenu par les deux méthodes sont rapporté dans le tableau 21 (annexe VI).

La figure 06 .Ci dessous illustre d'activité contre *Asp. niger* par la méthode des puits et disparation de cette activité.

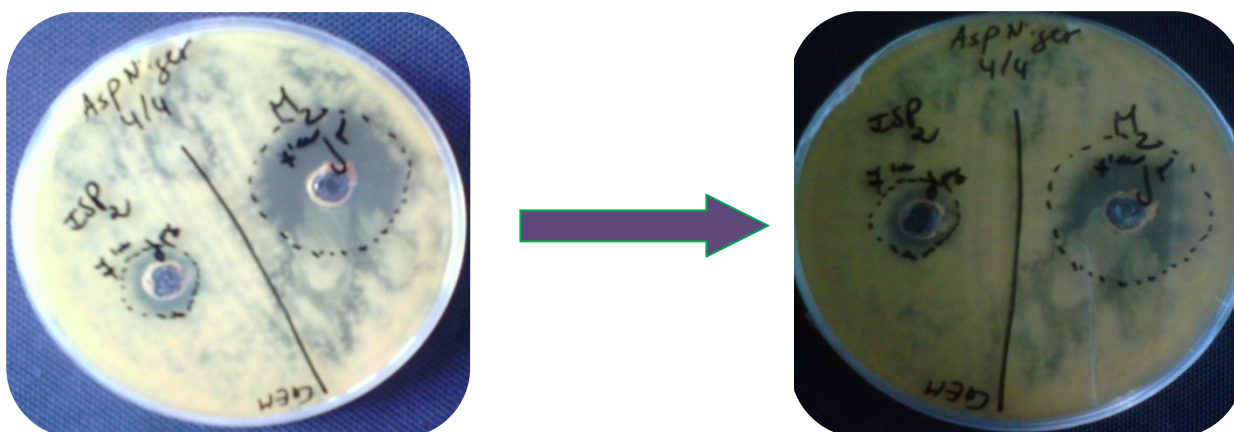


Figure 06 : Photographie illustrant l'activité de la souche SR1 vis-à-vis d'*Asp. niger*

D'après ces résultats on conclue que la souche SR1 possède une activité fongicide vis-a-vis *Aspergillus niger*. Valli et al., (2012) ont rapporté une activité fongicide contre *Candida albicans* ATCC 10231, *Fusarium oxysporum*, MTCC 3075 et *Aspergillus niger*.

3 .Choix du meilleur milieu de production d'antibiotique

Afin de sélectionner le meilleur milieu de production d'antibiotiques, l'activité antimicrobienne de la souche qui à été ensemencée sur les deux milieux différents (SCA et ISP2) est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar et celle-des puits. Vu l'absence de l'activité antibactérienne.

4. Mise en évidence de l'activité enzymatique

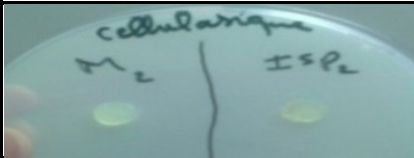

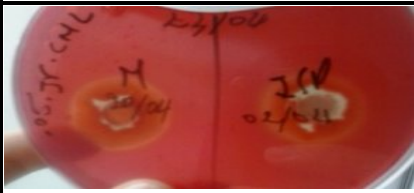
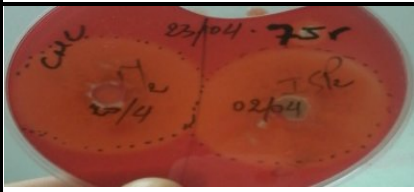
Dans cette étude, la souche étudiée à été testé pour son pouvoir d'hydrolyse enzymatique : cellulasique, xylanasique, L-asparaginasique, et chitinasique.

❖ Mise en évidence de l'activité cellulasique

La révélation de l'activité CMCCase est réalisée en versant une solution de rouge Congo à 0,1% (p/v), laisser agir pendant 20 min suivi d'une lavage avec une solution de NaCl à 1M pendant 15 min Ninranjane et al., (2007). La formation de zones orange claires autour des cylindres dans le milieu d'agar solide indique la capacité de la souche à utiliser le CMC comme seule source de carbone et d'énergie Teather et al., (1982). On observe que les diamètres des zones d'hydrolyses du CMC est plus large après le 7^{ème} jour par rapport aux 3^{ème} et 5^{ème} jours. Les résultats sont présentés dans le tableau 13.

Une cellulase à partir de *Streptomyces alcaliphiles* sp a été décrite par Singh et al.,(2004). D'autres travaux ont montrés qu'il ya eu production maximale dans une milieu contenant du CMC à 10% chez *Streptomyces drozdowiczii* Grigorevski de lima et al., (2005).

Tableau 13 : Mise en évidence de l'activité cellulase de la souche SR1.

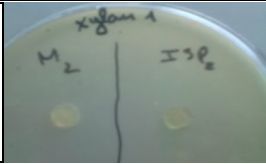


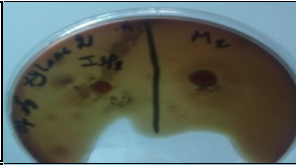

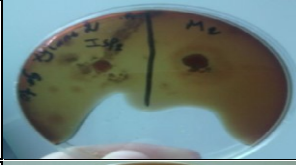
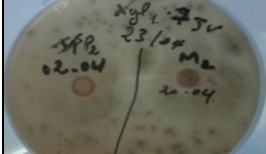

	Résultats	Images	Diamètre de la zone d'hydrolyse CMC
Témoin	/		/
Après le 3 ^{ème} jour	+		ISP2 : 14 mm M2 : 15 mm
Après le 5 ^{ème} jour	+		ISP2 : 15 mm M2 : 20 mm
Après le 7 ^{ème} jour	+		ISP2 : 40 mm M2 : 39 mm

❖ Mise en évidence de l'activité xylanase

L'activité xylanase de la souche a été évaluée par la méthode des cylindres d'agar sur un milieu contenant le xylane comme seule source de carbone Viet, (1991).

La visualisation des halos clairs autour des cylindres sur un fond marron correspond aux zones d'hydrolyse du xylane. Dans cette étude on a utilisé deux types de xylane (xylane de bouleau et xylane de maïs). Aucun apparition d'halos clairs autour des cylindres pendant 3^{ème}, 5^{ème} et 7^{ème} jours avec les deux types de xylane, ce qui indique que le xylane n'est pas dégradé par la souche (voir tableau 14). Les travaux de Ninawe et al., (2006) ont mise en évidence l'activité xylanase des souches d'actinomycètes.




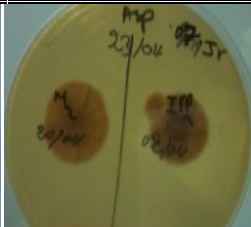
Tableau 14 : Mise en évidence de l'activité xylanase de la souche SR1.

	Xylane de bouleau		Xylane de maïs	
	Résultat	Image	Résultat	Image
Témoin	/		/	
Après le 3 ^{ème} jour	–		–	
Après le 5 ^{ème} jour	–		–	
Après le 7 ^{ème} jour	–		–	

❖ **Mise en évidence de l'activité L-asparaginase**

L'activité L- asparaginase de la souche est mise en évidence par le changement de la couleur de milieu de marron vers le rose. La couleur de milieu n'a pas changée donc la souche n'est pas productrice de la L-asparaginase. Les résultats sont présentés dans le tableau 15. A partir de *Streptomyces marinus* Gupta et al., (2007) et Basha et al., (2009) ont noté une production de cette enzyme par *S. aurantiacus* et *Streptomyces sp.* S3, S4 et K8 respectivement.




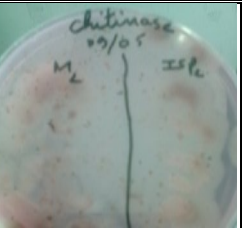
Tableau 15 : Mise en évidence l'activité L-asparaginase de la souche SR1.

	Témoin	Après le 3 ^{ème} jour	Après le 5 ^{ème} jour	Après le 7 ^{ème} jour
Résultats	/	–	–	–
Image				

❖ Mise en évidence de l'activité chitinasique

L'utilisation de la chitine comme seule source de carbone ce manifeste par l'apparition de halos clairs. Dans notre étude on n'a observé l'absence de halo claire car la souche n'a pas dégradée la chitine du milieu contenant également la vitamine B12. Les résultats sont présentés dans le tableau 16. Ohno et al., (1996); Okazaki, Takahashi, Kizuka, et Enokita, (1995) ont montré que parmi les actinomycètes, le *Streptomyces spp* est le meilleur producteur connu de chitinases. Iverson, Bromel, Anderson, et Freeman, (1984) ont montré qu'il est aussi produit par plusieurs autres Actinomycetes tel que *Nocardia*, *Actinoplanes*, et *Micromonospora spp*.

Tableau 16 : Mise en évidence l'activité chitinasique de la souche SR1.

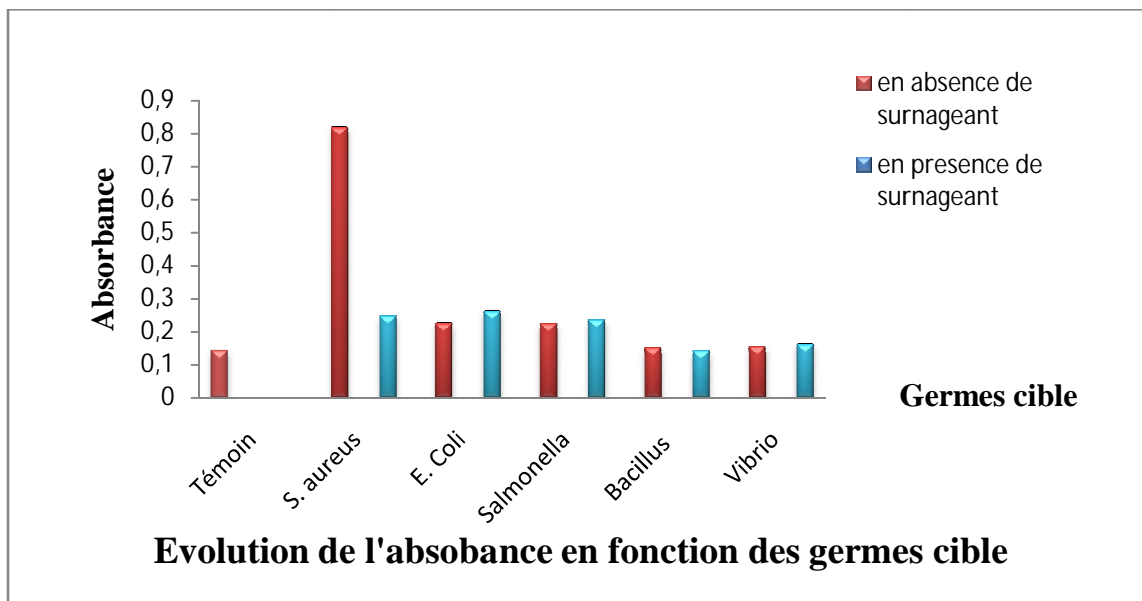
	Témoin	Après le 3 ^{ème} jour	Après le 5 ^{ème} jour	Après le 7 ^{ème} jour
Résultats	/	–	–	–
Image				

5. Activité anti-biofilms

Dans cette étude, on a voulu tester l'activité antibiofilm vis-à-vis des germes cible à Gram positif et Gram négatif à partir de surnageant de culture de notre actinomycète.

Les résultats illustrés dans la figure 07 montrent l'absence d'activité antibiofilm contre tous les germes testés à l'exception de *S. aureus*. Puisque la valeur de l'absorbance en absence de surnageant à augmenté lorsque on lui a ajoute le surnageant, par contre pour les autres germes la valeur de l'absorbances reste constante en présence et en absence de surnageant.

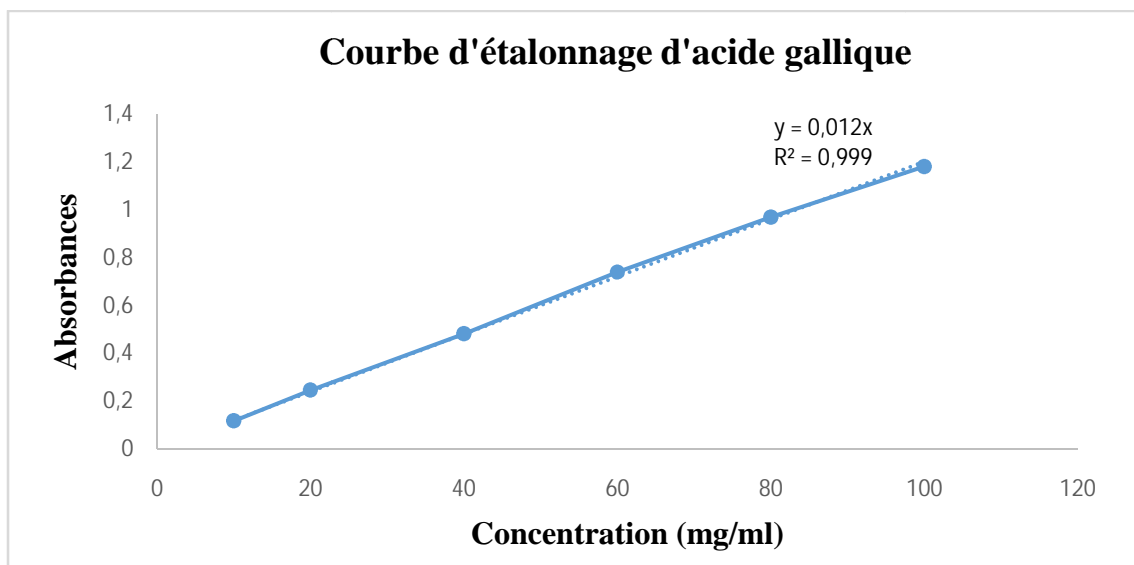
A partir de ces résultats on conclut que l'extrait de la souche réduit l'adhésion initiale et le développement du biofilm. You et al., (2007) ont rapporté l'activité de *Streptomyces marinus* comme microorganismes potentiels contre la formation des biofilms produits par *Vibrio spp*.

Figure 07 : Activité antibiofilms du surnageant de culture d'actinomycète.

6. Activité antioxydants

6.1. Dosage des polyphénols

Le surnageant obtenu a été analysé quantitativement avec un spectrophotomètre UV – visible pour sa teneur en polyphénols totaux. Les résultats sont exprimés en termes d'équivalent d'acide gallique à l'aide d'une courbe d'étalonnage. La teneur en composés phénoliques totaux est de 13.125 ± 0.205 mg GAE / ml (équivalent d'acide gallique par ml).

Figure 8 : Activité antioxydante de le surnageant en polyphénols de la souche SR1.

6.2. Evaluation de l'activité antioxydante par le diphényle-picryl-hydrazyl (DPPH)

Le test au DPPH (diphényl-picryl-hydrazyl) est une méthode largement utilisée dans l'analyse de l'activité antioxydante en raison de sa grande sensibilité. Ce test est basé sur la théorie selon laquelle les donneurs d'hydrogène sont des antioxydants. Joon-Kwan (2009). La présence de ces radicaux DPPH• se traduit par une coloration violette foncée de la solution, qui absorbe aux environs de 517 nm. Ce radical libre se transforme en DPPH stable (non radical) lorsqu'il absorbe l'hydrogène, sa couleur passe du violet au jaune clair et par conséquent, son absorption lumineuse à 517 nm diminue. Dans la réaction ci-dessous, le radical DPPH est représenté par D• et la molécule du donneur par AH, la réaction primaire est: $D \bullet + AH = DH + A \bullet$

En calculant l'ampleur du déclin de l'absorption de la longueur d'onde de 517 nm, nous pouvons estimer le pourcentage d'inhibition par le DPPH.

Le surnageant présente un pourcentage d'inhibition de 34.11 ± 0.287 %, ce résultat témoigne de la bonne capacité antioxydante de ce dernier, nous rappelons que plus la valeur du pourcentage d'inhibition est faible, plus l'extrait est puissante vis-à-vis des radicaux libres. Lee et al., (2014) ont déterminé l'activité antioxydante sur le surnageant brut d'acétate d'éthyle de l'isolat *Streptomyces sp.*

Conclusion

Conclusion

Conclusion

L'objectif de notre travail la mise en évidence des activités biologiques d'une souche d'actinomycètes isolée d'un milieu marin et appartenant à la collection du LMA.

L'ensemble des caractères culturels, morphologiques (macro et micromorphologie), ainsi que les caractères physiologiques et biochimiques étudiés, ont permis d'affilier la souche SR1 au genre *Streptomyces*.

L'étude de l'activité antifongique et antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar et des puits a montré que cette souche présente une activité antifongique contre *Aspergillus niger* mais aucune activité antibactérienne vis-à-vis des germes cibles à Gram positif et Gram négatif étudiés.

Les résultats de tests d'activité enzymatique ont montré que cette souche était capable de produire une CMCase parmi toutes les autres activités enzymatiques testées (activité chitinasique, activité xylanasiqque et activité L-asparaginasique).

La souche a révélé, également, une aptitude à former un antibiofilm contre *S.aureus*.

L'étude de l'activité antioxydante d'extrait de la souche d'actinomycète SR1 par la méthode DPPH a montré une activité antioxydante de l'extrait avec un pourcentage d'inhibition de $34,11 \pm 0,287\%$.

Toutefois, les résultats obtenus restent préliminaires et méritent d'être approfondis pour tirer des conclusions définitives et confirmées. Comme perspective, nous préconisons de poursuivre les recherches autour des axes suivants :

- faire une étude taxonomique approfondie par l'étude chimio taxonomique (composition chimique de la paroi cellulaire) et par l'étude moléculaire (ADNr 16 S, hybridation ADN/ADN) pour identifier la souche SR1 au niveau de l'espèce.
- Elargir le nombre et la gamme des germes cibles (bactéries et champignons), ainsi la mise en évidence d'autres activités enzymatiques.
- Extraction, purification et identification des molécules bioactives produites par la souche SR1 (antifongique et antioxydant) par l'utilisation des techniques plus performantes.

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Aouiche A, Sahaoy N, Meklat A, Zitouni A, Bijani C, Mathieu F et Lebrihi A. Saccharothrix sp.PAL54. A new chloramphenicol- producing strain isolated from a Saharan soil. *World. J. Microbiol. Biotechnol.* (2012); 28: 943-951.

Arumugam .M, Mitra .A, Jaisankar .P, Dasgupta .S, Sen .T, Gachhui .R,Mukhopadhyay U.K, Mukherjee. J. Isolation of an unusual metabolite 2-allyloxyphenol from a marine actinobacterium, its biological activities and applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* (2010); 86: 109–117.

Athalye. M, Goodfellow .M ,Lacey. J, White.R.P. Numerical Classification of *Actinomadura* and *Nocardioopsis*. *International journal of systematic bacteriology.* (1985); 35: 86-98.

Athalye.M, Lacey.J, Goodfellow. M. Selective isolation and enumeration of actinomycetes using rifampicin. *Journal of Applied microbiology.* (1981); 51: 289-297.

B

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

Badji .B, Mostefaoui .A, Sabaou .N, Lebrihi .A, Mathieu .F, Seguin et Tillequin .F. Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomurea sp.* NM94. *J.Ind. Microbiol. Biotechnol.* (2007); 34: 403-412.

Basha. S.N, Rekha. R, Komala.M, Ruby.S. Production of extracellular anti-leukaemic enzyme L-asparaginase from marine actinomycetes by solid-state and submerged Fermentation: Purification and characterization. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* (2009); 8: 353-360.

Bastide.A, de Méo.M, Andriantsoa.M, Laget.M, Duménil . G. Isolement et sélection de souches d'actinomycète productrices de substances antifongiques de structure non-polyéniques. *Mircen journal of applied microbiology and biotechnology.* (1986); 2: 453-466.

Becker. B,Lechevalier .M.P and Lechevalier .H.A. Chemical Composition of Cell-Wall Preparations from Strains of Various Form-Genera of Aerobic Actinomycètes. *Applied.Microbiology.* (1965); 13(2): 236-242.

Bérdy J. Bioactive microbial metabolites.*J.Antibiot.* (2005); 58(1): 1–26.

Billerbeck.V.G , Roques.C, Vanière. P, Marquier. P. Activité antibactérienne et antifongique de produits à base d'huiles essentielles. Laboratoire de Bactériologie, virologie et microbiologie industrielle. *Hygiene Review.* (2002). N°3.

Références bibliographiques

Bister. B, Bischoff. D, Stroebele .M, Riedlinger. J, Reicke .A, Wolter. F. Abyssomicin C—a polycyclic antibiotic from a marine *Verrucospora* strain as an inhibitor of the p-aminobenzoic acid/tetrahydrofolate biosynthesis pathway. *Angew Chem Int Ed* .(2004); 43(19): 2574–6.

Blunt. J.W, Copp. B.R, Keyzers. R.A, Munroa. M.H.G, Prinsep. M.R . Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* (2016); 33: 382–431.

Blunt.J.W, Copp. B .R, Munroa. M .H. G, Peter. T. N and Prinsep. M. R. Marine natural products. *Nat. Prod. Rep.* (2006); 23: 26-78.

Boubetra. D, Sabou. N, Zitouni. A, bijani .C, lebrihi. A et matieu. F. Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *saccharothrix* SA 198 isolated from a saharan soil. *Micrological. Research.* (2013); 186: 223-230.

Boudjellaa. H, Boutia. K, Zitouni. A, Mathieu. F, Lebrihib. A et Sabaoua. N. Taxonomy and chemical characterization of antibiotic of *Streptosporangium* sp 10 isolated from a Sahara soil *Microbiological Recherch.* (2006); 161: 288-289.

Brand-Williams. W , Cuvelier . M. E and Berset. C. L.W.T. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. In: *LWT- Food Science and Technology.* (1995); 28(1):25-30

D

Das.S,Ward.L.R and Burke.C. Prospects of using marine actinobacteria as probiotics in aquaculture. *Appl.Microbiol.Biotechnol.*(2008); 81: 419-429.

Dasari. V.R.R.K, Muthyala. M.K.K, Nikku. M.Y, Donthireddy. S.R.R. Novel Pyridinium com-pound from marine actinomycete, *Amycolatopsis alba* var. nov, DVR D4 showing antimicrobial and cytotoxic activities in vitro. *Microbiol Res.* (2012); 167: 346–51.

Dastager. S.G, Damare. S. Marine actinobacteria showing phosphate-solubilizing efficiency in Chorao Island, Goa, India. *Curr.Microbiol.* (2013); 66(5): 421-427.

Dekkers. J, Van Doornen. L, Kemper. H. The role of antioxidant vitamins and enzymes in the prevention of exercise-induced muscle damage. *Sports Med (Auckland, NZ).* (1996); 21(3): 213–38.

Demain. A.L, Sanchez. S. Microbial drug discovery: 80 years of progress. *The Journal of Antibiotics.* (2009); 62: 5-16.

Dharmaraj. S. Marine *Streptomyces* as a novel source of bioactive substances. *World J .Microbiol. Biotechnol.* (2010); 26(12): 2123–2139.

Donadio. S, Maffioli. S, Monciardini. P, Sosio. M, Jabes. D. Antibiotic discovery in the twenty-first century: current trends and future perspectives. *J. Antibiot.* (2010); 63: 340–423.

Références bibliographiques

E

Erikson. D. The morphology, cytology and taxonomy of the actinomycetes. *Annual Review of Microbiology.* (1949); 3: 23-54.

G

Ghanem. B.N, Soraya. A.S, Zeinab. M.E, Gehan.A.A.E. Isolation and enumeration of marine Actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *Applied Microbiology.* (2000); 46: 105-111.

Goodfellow. M. Actinobacteria phyl. Nov. In: Whitman W.B, Goodfellow .M, Kämpfer. P, Busse H-J, Trujillo M.E, Ludwig. W, Suzuki. K.I, Parte A (eds). *Bergey's Manual of systematic Bacteriology.* Vol 5: 2nd edn .The actinobacteria part B. Springer, New York. (2012); p: 33-34.

Goodfellow. M and Williams . S-T. Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*(1983); 37: 189-216.

Gordon. R.E, Barnett. D.A, Handarhan. J.E, Hor-Nay-Pang. C. *Nocardia coeliaca, Nocardia autotrophica* and the nocardin strains. *International journal of systematic bacteriology.* (1974); 24: 54-63.

Grigorevski de Lima A.L, Nascimento R.P, Bon E.P.S. and Coelho. R.R.R. Streptomyces drozdowiczii cellulose production using agro industrial by-products and its potential use in the detergent and textile industries. *Enzyme. Microbial. Technol.* (2005); 37: 272-277.

Gupta.N, Mishra. S, Basak. U.C. Occurrence of *Streptomyces aurantiacus* in mangroves of Bhitarkanika. *Malaysian Journal of Microbiology.*(2007); 3: 7-14.

H

Hassan. U. S. S, Anjum . K, Abbas . S. Q, Akhter. N, Shagufta. B. I, Shah. S. A. A, Tasneem .U. Review Emerging biopharmaceuticals from marine actinobacteria. *Environmental Toxicology and Pharmacology* (2017) ; 49: 34–47.

Hosney.M.S, El-Shayeb. N. A, Abood. A and Abdel-Fattah.A.M. A potent Chitinolytic Activity of Marine Actinomycete sp. and Enzymatic production of Chitooligosaccharides. *Australian jour. of Basic and Applied Sciences.* (2010); 4: 615-623.

I

Iverson.K.L,Bromel.M.C,Anderson.A.W.Freeman.T.P. Bacterial symbionts in the sugar Beet Root Maggot ,*Tetanops myopaefornis*(Von Röder).*Appl. Environ Microbiol.*(1984); 47(1): 22-7.

Références bibliographiques

J

Jenson. P.R and Lauro. F. M. An assessment of antibacterial diversity in the marine environment. *Antonie Van Leeuwenhoek* (2008); 94 : 51-62.

Joon-Kwan.Moon and Takayu.ki.Shibamoto.Antioxidant assays for plant and food componants . *Journal of agricultural and food chemistry.* (2009); 57(5): 1655-1666.

K

Kaczmariski. M, Wójcicki. J, Samochowiec. L, Dutkiewicz. T, Sych. Z. The influence of exogenous antioxidants and physical exercise on some parameters associated with production and removal of free radicals. *Pharmazie* (1999); 54: 303-6.

Kähkönen.M.P,Hopia.A.L ,Vuorela.H.J,Rauha.J.P,Pihlaja.K,Kujala.T.S,Heimonen.M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds .*Jaqríc food chem.* (1999); 47(10): 3954-62.

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

Kitouni. M, Boudemagh .A, Oulmi. L, Reghioia .S, Boughachiche. F, Zerizer. H, Hamdiken. H, Couble. A, Mouniee .D, Boulahrouf. A and Boiron .P. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *Journal de Mycologie Médicale.* (2005); 15: 45–51.

Kokare. C.R, Mahadik. K.R, Kadam. S.S and Chopade. B.A. Isolation of bioactive marine actinomycetes from sediments isolated from Goa and Maharashtra coastlines (west coast of India). *Indian J. Mar. Sci.* (2004); 33 (3): 248–256.

L

Lechevalier .H.A and Lechevalier .M.P. (1970a).Acritical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes . In: *The Actinomycétales* (edited by Prauser).Gustav.Fisher Verlag,Jena.P. 395-405.

Lee.S.Y,Ramirez.J,Franco.M,Lectez.B,Gouzaley.M,Barrio.R,Mayor.U. Ube 3a,the E3 ubiquitin ligase causing angelman syndrome and linked to antism,regulates protein homeostasis through the proteasomal shuttle Rpn 10. *Cell Molec.Life.Sci.*(2014); 71(14): 2747-2758.

Lee. J.G, Yoo. I.D, Kim. W.G. Differential antiviral activity of benzastatin C and its dechlorinated derivative from *Streptomyces nitrosporeus*. *Biol Pharm Bull.* (2007); 30(4): 795–7.

Références bibliographiques

Locci. R and Sharples . G. P. Morphology. In: Goodfellow.G. M, Mordarski.M,Williams. S.T. (eds).The biology of Actinomycetes. Academic ,orlandon. (1984) ; p: 165-199.

Lamari.N.L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat en biologie, option microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi-Ouzou, p.156.

M

Madigan .M. T,Martinko. J. M, Parker. J and Brock. T. D.Biology of microorganisms. Prentice Hall. Upper Saddle River.N.J. (1987); vol.985.

Maestro. B, Sanz. J.M. Novel approaches to fight *Streptococcus pneumoniae*. *Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery*. (2007); p : 2188-196.

Manivasagan.P, Gnanam.S, Sivakumar.K, Thangaradjou.T,Vijayalakshmi.S, Balasubramanian.T. Antimicrobial and cytotoxic activities of an actinobacteria (*Streptomyces* Sp. PM32) Isolated from offshore sediments of the Bay of Bengal in Tamil. *International Journal of Advanced Research in Biological Sciences*. (2009); 3: 231-236.

Manivasagan. P, Venkatesan. J, Sivakumar. K, Kim.S.K. Marine actinobacterialmetabolites:current status and future perspectives. *Microbiol.Res* (2013); 168(6): 311–332.

Manivasagan. P, Venkatesan. J, Sivakumar. K, Kim. S.K. Pharmaceutically active secondary metabolites of marine actinobacteria. *Microbiol . Res .* (2014); 169: 262-278.

Marchal. N, Bourdon. J.L, Richard. C.I. Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. *Doin editor*. Paris. (1991); p: 67-122.

Margalith. P. Z. Pigment microbiology. Shapman & Hall. London . (1992); p: 5-114.

Matan.N. Antifungal activities of anise oil, lime oil, and tangerine oil against molds on rubberwood (*Hevea brasiliensis*). *International Biodeterioration and Biodegradation*. (2008); 62: 75-78.

Meena. B, Rajan. L.A, Vinithkumar. N.V, Kirubakaran. R. Novel marine actinobacteria from emerald Andaman & Nicobar Islands: a prospective source for industrial and pharmaceutical byproducts. *BMC microbial*, (2013); 13(1): 1.

Metchnikoff. E. Lactic acid as inhibiting intestinal putrefaction. In: The prolongation of life; optimistic studies, London: W. Heinemann. (1907); p: 161-183.

Mizukami. T, Masato Ikeda. K. R, Miyake. K and Nakano. T. Mecanism of the incidental production of melanin-like pigment during 6-Demethylchlortetracycline production in *Streptomyces aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol*. (2000); 66 (4): 1400-1404.

Mohankumar. T, Krishnan. K .Antimicrobial and antioxidant properties of marine actinomycetes *Streptomyces sp* VITSTK7 *Oxid Antioxid Med Sci*. (2012); 1(1): 51-57.

Références bibliographiques

N

Nagaseshu.P, Gayatri Devi.V, Anil Kumar. B, Seema Kumari, Murali Mohan .G, Rama Rao Malla. Antioxydant and antiproliferative potentials of marine Actinomycetes. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* ISSN- 0975-1491. (2016); Vol 8, Issue 8.

Niladevi .K.N, Sukumaram.R.K, Anisha .G.S, Prema .p. Optimization of laccase production from a novel strain- *Streptomyces psammoticus* using response surface methodology. *Microbiological Research*. (2008). 164(1): 105-113.

Ninawe.S, Lal.R and Kuhad.R.C. Isolation of three xylanase-producing strains of Actinomycetes and their identification using molecular methods. *Current Microbiology*. (2006); 53: 178–182.

Niranjane.A. P, Malhou. P, Stevenson.T.W. The effect of carbohydrate carbon sources on the production of cellulase by *Phlebia gigantea*. *Enzyme and Microbial Technology*. (2007); 40: 1464-1468.

Nouasri. A. Les genres *Microellobosporia, Saccharomonospora, Thermoactinomyces et Thermomonospora (Actinomycetales)* dans les sols sahariens : Taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. *Thèse de Magister*. (1996) ; p: 130.

O

Oskay.M, Tamer.A.U and Azeri .C. Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of biotechnology*. (2004); 3(9): 441-446.

O'Toole.E.T et al. High-voltage electron tomography of spindle pole bodies and early mitotic spindles in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. (1999); 10(6): 2017-31.

P

Pandey. A, Nigam .P, Soccol. C.R, Soccol. V.T, Singh .D and Mohan. R. Advances in microbial analysis. *Biotechnol. Appl. Biochem.* (2000); 31: 135-152.

Park. J.O, El-Tarabily.K.A, Ghisalberti.E.L and Sivasithamparam.K. Pathogenesis of *Streptovorticillium albireticuli* on *Caenorhabditis elegans* and its antagonism to soil-borne fungal pathogens. *Letters in Applied Microbiology*. (2002); 35: 361-365.

Patel. J.J, Brown. M.N. Interaction of *Azobacter* with rhizosphere and root- surface microflora. *Plant and soil*. (1969); 31: 273-281.

Patil.R.C, Mule. A.D, Mali. G.V, Tamboli.R.R, Khobragade. R.M, Gaikwad. S.K, Katchi. V.I and Patil. D. Isolation of Marine Actinomycetes from the Mangroves. (2011).

Pimentel-Elardo.S.M, Kozytska. S, Bugni.T.S, Ireland.C.M, Moll. H, Hentschel.U. Antiparasitic compounds from *Streptomyces sp.* Strains isolated from Mediterranean sponges. *Mar Drugs*. (2010); 8(2): 373–80.

Références bibliographiques

Pridham. T.G, Gottlieb.D. The Utilization of Carbon Compounds by Some Actinomycetales as an Aid for Species Determination. *Journal Bacteriology*. (1948); 56: 107-114.

Q

Qinyuan. L, Chen. X, Jiang.Y and Chenglin. J. Morphological Identification of Actinobacteria. Additional information is available at the end of the chapter 3.<http://dx.doi.org/10.5772/61461>. (2016).

R

Ribéreau-Gayon,(1968). Les composés phénoliques des végétaux .Dumod. Editeur, paris (anglais translation ,1972.Hafner. Publishing .Co. New. York. XVI+254p).

Riedlinger. J, Reicke. A, Zähler. H, Krismer.B, Bull. A.T, Maldonado.L.A. Abyssomicins, inhibitors of the para-aminobenzoic acid pathway produced by the marine *Verrucosipora* strain AB-18-032. *J. Antibiot.* (2004); 57(4): 271–9.

S

Sanchez-Moreno. Review :Methods used to evaluate the free radical .Scavenging Activity in Foods and Biological Systems.Food science and technology international . (2002); 8(3): 121-137.

Sanglier. J.J, Haag.H, Huck.T.A and Fehr .T. Review of actinomycetes compounds 1990-1995. *Expert. Opin. Invest. Drugs.* (1996); 5: 207-223.

Sanglier. J.J, Trujillo. M. Substances bioactives produites par les actinomycetes et stratégie de sélection des souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.* (1997) ; p: 12-13.

Schmid. R. D and Verger .R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* (1998); 37: 1608-1633.

Shin .H.J, Kim .T.S, Lee .H-S, Park .J.Y, Choi .I-K, Kwon .H.J. Streptopyrrolidine, an angiogenesis inhibitor from a marine-derived *Streptomyces* spp. KORDI-3973. *Phytochemistry.*(2008); 69: 2363–2366.

Shirling .E. B, Gottlieb.D. Methods for Characterisation of *Streptomyces* Species. *International journal of systemic and evolutionary microbiology.* (1966); 16(3): 313-340.

Sierra.G. A .Simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates.*Journal of Microbiology Serology.* (1957); 23: 15-22.

Singh. S, Baruah. I and Bora. T. C. Actinomycetes of Loktak Habitat: Isolation and Screening for Antimicrobial Activities. *Biotechnology.* (2006); 5: 217-221.

Références bibliographiques

Sirisha. B, Haritha.R, YSY.V, Jagan. M, Siva Kumar.K, Ramana.T. Bioactive compounds from marine actinomycetes isolated from the sediments of bay of Bengal. *International Journal Of Pharmaceutical Chemical and Biological Science.* (2013); 3: 257-264 .

Sivakumar . K, Kumar Sahu. M,Thagaradjou.T and kannan.L.Research on marine actinobacteria in India.*Indian .J.Microbiol.*(2007); 47: 186-196.

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse.France. p 251.

Smaoui. S, Hlima H. B. Effects of parabens and isothiazolinone on the microbiological quality of baby shampoo: the challenge test.Laboratory of Microorganisms and Biomolecules. Laboratory of Microorganisms and Biomolecules, Centre of Biotechnology of Sfax, Road of Sidi Mansour Km 6, PO Box 1177, Sfax 3018, Tunisia. *Biocontrol .Sci.* (2012); 17(3):135-42.

Solanki. R, Khanna. M, Lal. R. Review bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* (2008); 48: 410–431.

Srivibool.R. and Sukchotiratana.M. Bioperspective of actinomycetes isolates from castal soils: A new source of antimicrobial producers. *Songklanakar J.Sci. Technol.*(2006); 28(3), 493-499.

Stackebrandt .E, Rainey .F.A,Ward-Rainey.N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. Journal.Syst. Bacteriol.Apr.* (1997); 47(2): 479-491.

Sudo.K, Konno. K, Yokota.T and Shigeta.S. A. Screening system for antiviral compounds againts Herpes simplex virus type 1 using the MTT method with L 929 cells.Tohuku. *J. Exp .Med.* (1995); 176(3): 163-071.

T

Takahashi .Y and Omura .S. Isolation of new actinomycetes strains for the screening of new bioactive compounds. *J .Gen .Appl. Microbiol.* (2003); 49(3): 141-054.

Tanaka.Y and Omura. S. Metabolism and products of Actinomycetes - An introduction. *Actinomycetologica.* (1990); 4(1): 13-14.

Teather.R.M. Use of Congo red-polysaccharide interations in enumeration and characterization of cellulolytic bacteria from the bovine rumen. *Applied and Environmental Microbiology.* (1982); 43: 777-780.

Theilleux. J.Les actinomycètes in Microbiologie industrielle: Les microorganismes d'intérêt industriel, Leveau. J.Y et Mouix. M. Lavoisier Tech et Doc, Apria.(1993);612 : 425.

V

Valan.A.M,Duraipandiyan.U,Agastian.P,Lgmacimuthu.S. Antimicrobial activity of Streptomyces SPP.ERL-26 recovered from Western Ghats of Tanil Nadu.*J.Mycol.Med.* (2008); 18: 147-153.

Références bibliographiques

Valli. S, Sugasini. S. S, Aysha. O, Nirmala.S, Vinoth Kumar.P, Reena. An Antimicrobial potential of Actinomycetes species isolated from marine environment. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine.* (2012); 2: 469-473.

Viet.D.N, Kamio.Y, Abe. N, Kaneko. J, K. Izaki. Purification et propriétés des bêta-1, 4-xylanase de *Aeromonas caviae W-61.* *Applied Environment Microbiology.*(1991) ; 57: 445-449.

Vitale. M, Scatassa. M.L, Cardamone. C, Oliveri. G, Piraino. C, Alduina. R, Napoli. C. Staphylococcal food poisoning case and molecular analysis of toxin genes in *Staphylococcus aureus* strains isolated from food in Sicily, Italy. *Foodborne Pathog Dis.* (2015); 12(1): 21-3.

Vonothini.G, Murugan.M, Sivakumar.K and Sudha. S. Optimization of protease production by an actinomycete Strain, P.S-18A isolated from an estuarine shrimp pond. *African journal of Biotechnology.* (2008); 7(18): 3225-3230.

W

Wayne .L.G, Brenner .D.J, Colwell .R.R, Grimont .P.A.D,Kandler. O, Krichevsky. M.I, Moore. L.H, Moore .W.E.C,Murry R.G.E,Stackebrandt .E,Starr M.P et Trüper .H.G. .Report of the Ad Hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *International .Journal .Systematic and evolutionary microbiology.* (1987); 37: 463-464.

Weyland. H. Actinomycetes in North Sea and Atlantic Ocean sediments. *Nature.* (1969); 223:858.

Williams. S.T and Cross.T. Actinomycetes. In: *Methods in microbiology. Booth C. Ed. Academic . Press. London.* (1971); 4: 295-334.

Williams.S.T, Locci .R, Beswick .A, Kurtboke .D.I, Kuznetsov .V.D , Le Monnier. F.J, Long .P.F, Maycroft. K.A, palma .R.A, Petrolini .B, Quaroni .S, Todd. J.I et West .M. Detection and identification of novel actinomycetes. *Res. Microbiol.* (1993); 144(8): 653-6.

Williams.W, Michael.G, Peter.K, Hans-Jurgen.B, Martha.T, Wolfgang.L, Kemichiro.S. *Bergey's Manual of systematic Bacteriology.* Vol 5: the actinobacteria. (1965); p: 1792.

Y

Yamaguchi.T. Comparison of the Cell-Wall Composition of Morphologically. Distinct. Actinomycètes. *Journal of Bacteriology.* (1965); 89(2): 444-453.

You. J, Cao. L, Liu. G, Zhou. S, Tan. H, Lin. Y. Isolation and characterization of actinomycetes antagonistic to pathogenic *Vibrio spp.* from nearshore marine sediments. *World Journal of Microbiology and Biotechnology.* (2005); 21: 679-682.

You. J.L, Xue. X.L, Cao. L.X, Lu. X, Wang. J, Zhang. L.X. Inhibition of *Vibrio* biofilm formation by a marine actinomycete strain A66. *Applied Microbiology and Biotechnology.* (2007); 76: 1137-1144.

Annexes

Annexes

❖ Matériel utilisé (Annexe I)

- Balance
- Autoclave
- Bain- Marie
- Bec benzène
- Etuve à 28°C et à 37°C
- pH mètre
- Micro pipette de 1000 µL
- Microscope optique
- Flacons
- Tubes à essais
- Boîtes de pétri
- Bêchers
- Plaque agitatrice
- Pipettes pasteur
- Baro-Magnétique
- Anse de platine
- Spectrophotomètre
- Vortex
- Four pasteur
- Eprouvette
- Erlenmeyers
- Ecouvillons

❖ Milieux de culture utilisés (Annexe II)

Starch Casein Agar (SCA) (M2) (Poosarla et al, 2013)

Amidon.....	1 g
Caséine.....	0,3 g
KNO ₃2 g
NaCl.....	.2 g
K ₂ HPO ₄	2 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,05 g
CaCO ₃0,02 g

Annexes

FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,01 g
Agar	18 g
1 litre d'eau de mer 50% (50% eau de mer et 50% eau distillée).	
pH.....	7,4±0,2

Mueller-Hinton (Williams et Kuster, 1964)

Extrait de viande	2 g
Hydrolysate acide de caséine.....	17,5 g
Amidon.....	1,5 g
Agar.....	10 g
1 litre d'eau de mer 50%.	
pH.....	7,3

Gélose nutritive (GN)

Extrait de viande.....	1 g
Extrait de levure.....	2 g
Peptone.....	5 g
NaCl.....	5 g
Agar.....	15 g
1 litre d'eau de mer 50%	
pH.....	7,4±0,2

Bouillon nutritive(BN)

Peptone.....	10 g
Extrait de viande.....	5 g
Chlorure de sodium.....	5 g
pH.....	7,4±0,2

Gélose à l'extrait de malt (GEM)

Extrait de malt.....	30,0 g
Agar bactériologique.....	15,0 g
1 litre d'eau de mer 50%	
pH.....	5,6±0,2

L'activité cellulasique

CMC.....	7 g
NaNO ₃	1,2 g

Annexes

KH ₂ PO ₄	3,0 g
K ₂ HPO ₄	6,0 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 g
CaCl ₂	0,05 g
MnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,01 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,001 g
Extrait de levure.....	1,0 g
NH ₄ Cl.....	2 g
NaCl.....	2 g
Agar.....	18 g
pH.....	7,2

L'activité xylanasiqne (xylane de bouleau)

Xylan.....	7 g/l
Extrait de levure	2 g/l
NaCl.....	2,5 g/l
NH ₄ Cl.....	5 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
Na ₂ HPO ₄	30 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0, 25 g/l
Agar.....	15 g/l
pH.....	7,2

L'activité xylanasiqne (xylane de mais)

Xylan (Xylooligosaccaride 95%).....	7 g/l
Extrait de levure	2 g/l
NaCl.....	2,5 g/l
NH ₄ Cl.....	5 g/l
KH ₂ PO ₄	15 g/l
Na ₂ HPO ₄	30 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,25 g/l
Agar.....	15 g/l
pH.....	7,2

Annexes

L'activité asparaginase

Na ₂ HPO ₄ , 2H ₂ O.....	6 g
KH ₂ PO ₄	3 g
NaCl.....	0,5 g
L-asparagine.....	5 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,5 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O.....	0,014 g
Glucose.....	2% w/v
Agar.....	20 g
Rouge de phénol.....	0,0001 g
pH.....	7,2

Chitine-vitamine B12

Chitine.....	2 g/l
K ₂ HPO ₄	0,35 g/l
KH ₂ PO ₄	0,15 g/l
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0, 2 g/l
NaCl.....	0,3 g/l
CaCO ₃	0,02 g/l
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,01 g/l
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,001 g/l
MnCl ₂ , 4H ₂ O.....	0,001 g/l
Agar.....	18 g/l
Vitamine B12	50 µg/ml (60 gélules de 250 µg)
pH.....	7,2

Milieux d'identification (Annexe III)

1. Etude morphologique

Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'«International Streptomyces Project»
(Shirling et Gottlieb, 1966)

1.1. Le milieu ISP1

Tryptone.....	5 g
Extrait de levure.....	3 g
Agar.....	15 g

Annexes

1 litre d'eau de mer 50% (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)

pH.....7,5

1.2 Milieu ISP2

Glucose..... 4 g

Extrait de levure..... 4 g

Extrait de malt..... 10 g

Agar..... 20 g

1 litre d'eau de mer 50% (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)

pH.....7,98±0,2

1.3. Le milieu ISP4

Amidon.....10 g

K₂HPO₄.....1 g

MgSO₄, 7H₂O.....1 g

NaCl.....1 g

(NH₄)₂SO₄.....2 g

CaCO₃.....2 g

Solution saline standard.....1 mL

Agar.....20 g

1 litre d'eau de mer 50% (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)

pH.....7,5

* Solution saline standard

FeSO₄, 7H₂O.....0,1 g

MnCl₂, 4H₂O.....0,1 g

ZnSO₄, 7H₂O.....0,1 g

Eau distillée.....1000 mL

1.4. Le milieu ISP7

Glycérol.....15 g

L-tyrosine.....0,5g

L-asparagine.....1 g

K₂HPO₄.....0,5 g

MgSO₄, 7H₂O.....0,5 g

NaCl.....0,5 g

FeSO₄, 7H₂O.....0,01 g

Annexes

Solution saline standard (voir ISP4).....	1 mL
Agar.....	18 g
1 litre d'eau de mer 50% (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)	
pH.....	7,5

1.5. Le milieu ISP9

(NH ₄) ₂ SO ₄	2,64 g
KH ₂ PO ₄	2,38 g
K ₂ HPO ₄	5,65 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	1 g
Agar.....	20 g
1 litre d'eau de mer 50% (500 mL d'eau distillée et 500 mL d'eau de mer)	
pH.....	7,5
Solution saline*.....	1 mL
CuSO ₄ , 5H ₂ O.....	0,64 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,11 g
MnCl ₂ , 4H ₂ O.....	0,79 g
ZnSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,15 g
Eau distillée.....	1000 mL

Milieu OGA

Extrait de levure.....	5,0 g
Glucose.....	20,0 g
Oxytétracycline.....	0,1 g
agarbactériologique.....	15,0 g
1 litre d'eau de mer 50%.	

2. Etude physiologique

2.1. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1987)

Amidon.....	10 g
Gélose nutritive.....	2,8 g
Eau distillée.....	100 mL
pH.....	7,5

2.2. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1987)

Gélatine.....	0,4 g
Gélose nutritive.....	2,8 g

Annexes

Eau distillée.....	100 mL
pH.....	7,5

2.3. Dégradation de la tyrosine (Goodfellow, 1971 ; Gordon et al, 1974)

Tyrosine.....	0,4 g
Gélose nutritive.....	2,8 g
Eau distillée.....	110 mL
pH.....	7,5

2.4. Dégradation du tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80.....	10 mL
NaNO ₃	1 g
Extrait de levure.....	5 g
CaCl ₂ , 2H ₂ O.....	0,1 g
Agar.....	18 g
Eau distillée.....	1000 mL
pH.....	7,5
*Solution saline.....	50 mL
K ₂ HPO ₄	0,25 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,125 g
NaCl.....	0,125 g
FeSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,001 g
MnSO ₄	0,001 g
Eau distillée.....	50 mL

2.8. Dégradation des sels de sodium (Gordon et al, 1974)

NaCl.....	2 g
MgSO ₄ , 7H ₂ O.....	0,2 g
(NH ₄) ₂ HPO ₄	1 g
KH ₂ PO ₄	0,5 g
Agar.....	15 g
Rouge de phénol à 0,04%	20 mL
Eau distillée.....	100 mL
pH.....	7,5

3. Etude biochimique

3.1. Production de nitrate réductase

Bouillon nitrate

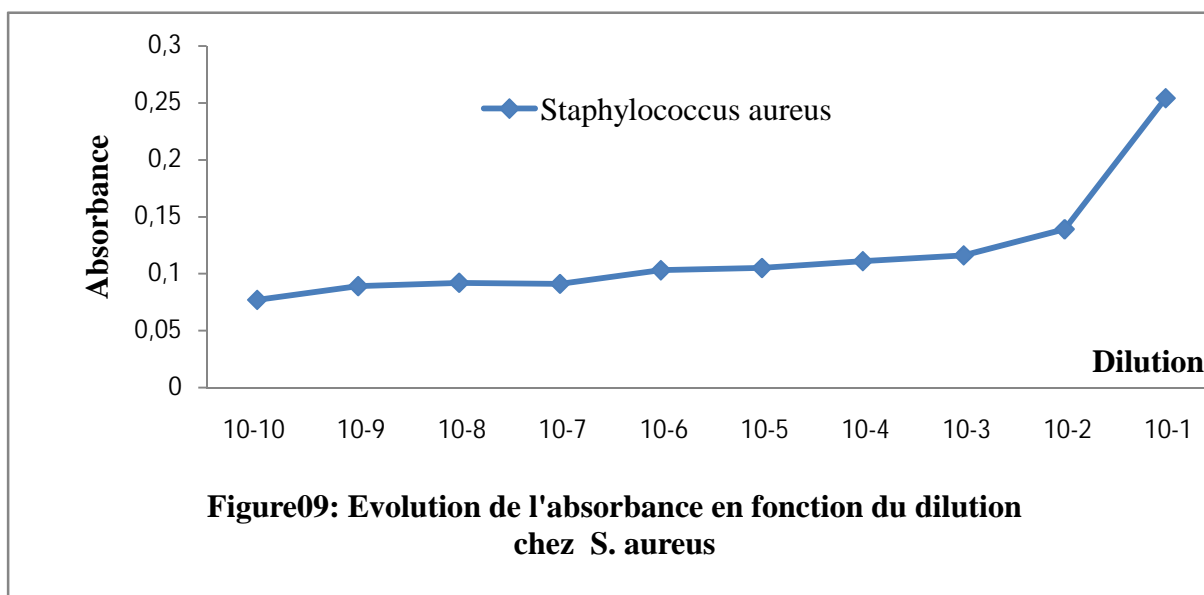
Infusion cœur-cerveau.....	25,0 g
Nitrate de sodium.....	10,0 g
Eau distillée.....	1 L
pH	7,2

3.2. Sensibilité aux différents agents chimiques

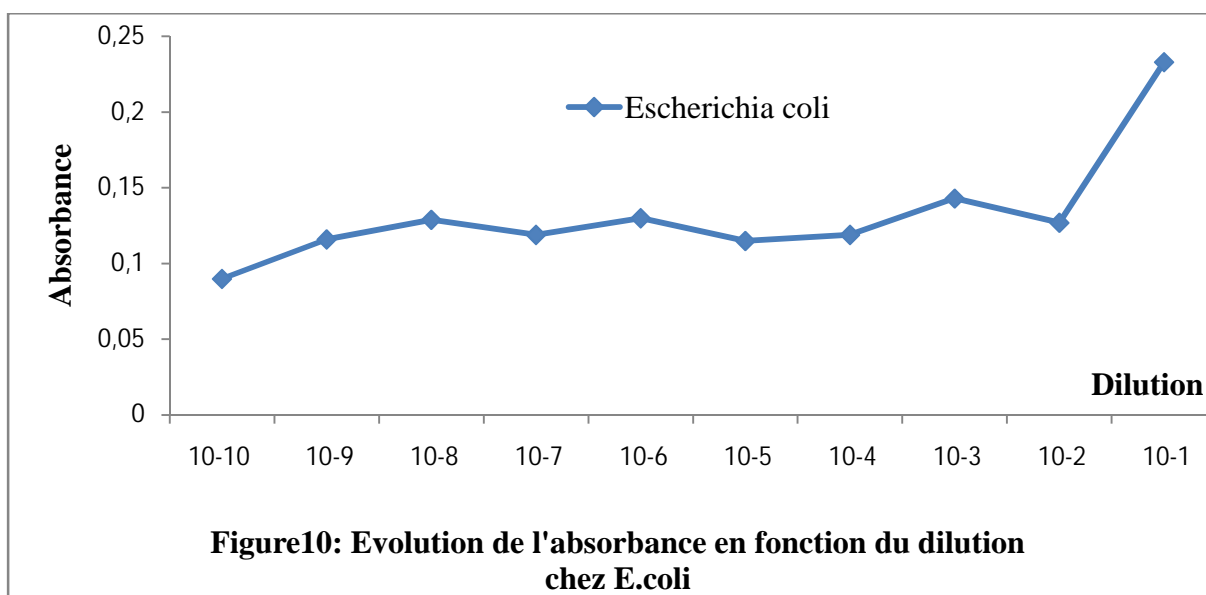
Glucose-Yeast Extract-Agar (G.Y.E.A)

Extrait de levure.....	10 g
Glucose.....	10 g
Agar.....	18 g
pH.....	6,8

Annexe IV:



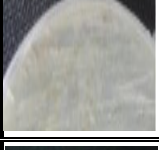
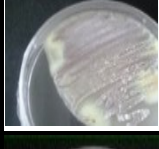




Annexes



Annexe V

Tableau 18 : Croissance de la souche SR1 sur différents milieux de culture après 14 jours

Période d'incubation	Milieu de culture	Croissance	Sporulation	Couleur de mycélium aérien	Couleur de mycélium de substrat	Production de Pigment diffusibles	Image
14 ^{ème} jour	ISP1	++	+	Blanc	Beige	-	
	ISP2	+++	+	Gris	Rose claire	-	
	ISP3	+	+	Gris	Beige	-	
	ISP4	+++	+	Blanc	Rose foncé	-	
	ISP7	+++	+++	Blanc	Rose foncé	-	
	ISP9	++	++	Gris	Rose claire	-	

Annexes


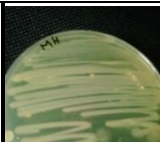


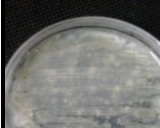

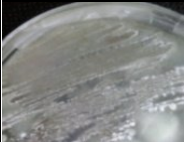


14 ^{ème} jour	GYEA	+++	+	Blanc	Beige	-	
	GEM						ND
	MH	-	-	-	Jaune	-	
	GN	++	+	Blanc	Jaune	-	
	OGA	++	+	Gris	Beige	-	
	M2	+	+	Blanc	Beige	-	

Tableau 19 : Croissance de la souche SR1 sur différents milieux de culture après 21 jours.

Période d'incubation	Milieu de culture	Croissance	Sporulation	Couleur mycélium aérien	Couleur de mycélium de substrat	Production de pigment diffusibles	Image
21 ^{ème} jour	ISP1	++	+	Blanc	Beige	-	
	ISP2	+++	++	Gris	Marron	-	
	ISP3	+	+	Gris	Beige	-	
	ISP4	+++	++	Gris	Rose foncé	-	

Annexes






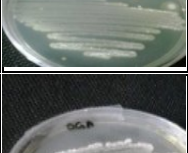
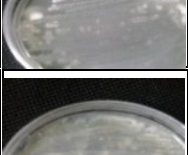


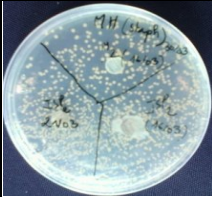
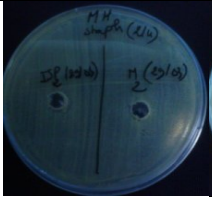
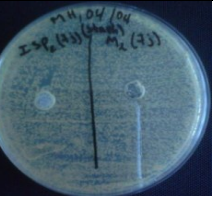
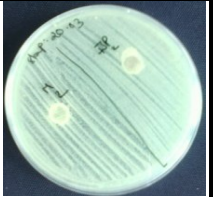



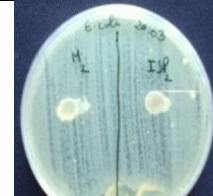



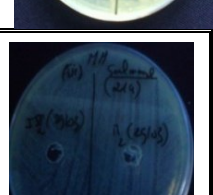


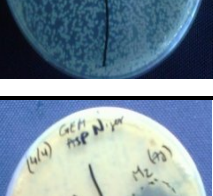




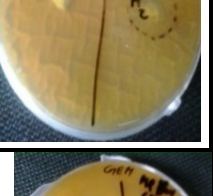
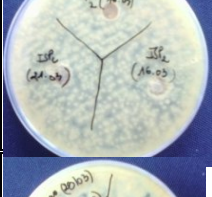
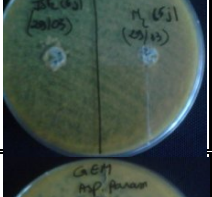

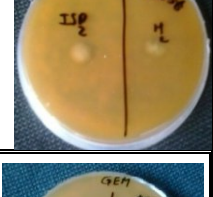
21 ^{ème} jour	ISP7	+++	+++	Blanc	Rose foncé	-	
	ISP9	++	++	Gris	Rose claire	-	
	GYEA	+++	+	Blanc	Beige	-	
	GEM						ND
	MH	+	-	-	Jaune	-	
	GN	++	+	Blanc	Jaune	-	
	OGA	++	+	Gris	Beige	-	
	M2	+	+	Blanc	Beige	-	

Tableau 20 : Croissance à différents pH après 14 jours et 21 jours.

Période	Croissance à différents pH	Résultat	Image
14 ^{ème} jour	7	+	
	5	-	ND
	9,5	-	ND
21 ^{ème} jour	7	+	
	5	-	ND
	9,5	-	ND

Annexes

Tableau 21: Résultats des testes d'activité antibactérienne et antifongique par la méthode des cylindres d'agar et des puits.

		La méthode des disques d'agar	La méthode des puits		
Type de germe cible	Non de germe cible	Photographie après 24h d'incubation	Photographie après 5 ^{ème} jour d'incubation	Photographie après 7 ^{ème} jour d'incubation	Photographie après 9 ^{ème} jour d'incubation
Bactéries à Gram positif	<i>Staphylococcus aureus</i>				
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>				
	<i>Salmonella typhi</i>				
Moisissure	<i>Aspergillus niger</i>				
	<i>Aspergillus flavus</i>				
	<i>Aspergillus parasiticus</i>				

Résumé

Après la revivification de la souche d'actinomycète SR1 isolée de sédiments marins, plusieurs tests ont été réalisés dans le but de mettre en évidence des activités biologiques.

A partir de l'étude des critères, morphologiques, physiologiques et biochimiques, la souche SR1 a été rattachée au genre *Streptomyces*.

Par la méthode des cylindres d'agar et des puits, la souche SR1 ne présente aucune activité antibactérienne vis - à - vis des germes cible pathogènes à Gram négatif (*E.coli* et *S.Typhi*) et Gram positif (*S.aureus*). Une activité fongicide contre *Aspergillus niger* est signalée par la méthode des puits. Les tests enzymatiques ont révélé la capacité de la souche SR1 à produire des CMSases mais pas de xylanases et L-aspariginases par la méthode des cylindres d'agar et chitinases par la méthode de touche.

Par ailleurs, une activité antibiofilm contre *S. aureus* notée, aucune activité n'a été obtenu a l'encontre de *E.coli*, *Bacillus*, *Salmonella* et *Vibrio* par la méthode de microplaque.

L'activité antioxydante de l'extrait de la souche SR1 a été évaluée et estimée à $34,11 \pm 0,287\%$ par la méthode DPPH.

Mots clé : Actinomycètes marins, *Streptomyces*, activité antimicrobienne, activité enzymatique, activité antioxydante, activité antibiofilm.

Abstract

After revivification of the actinomycete strain SR1, isolated from marine sediment, several tests were carried out in order to determine its biological activities.

From morphological, physiological and biochemical characterization study we suggest that the strain SR1 has been connected to the *Streptomyces* genera.

By both the agar cylinders and wells methods, the strain SR1 doesn't present any antibacterial activity against the target pathogenic germs: Gram negative (*E.coli* and *S.Typhi*) and Gram positive (*S.aureus*). An fungicide activity against *Aspergillus niger* is obtained by the wells method.

The enzymatic test, revealed the capacity of the strain SR1 to produce CMSase, but no of xylanase and L-aspariginase by the using the agar cylinders method. No activity chitinase by the touches method was observed.

Otherwise, an activity antibiofilm against *S.aureus* noticed, no activity has been gotten has the against *E. coli*, *Bacillus*, *Salmonella* and *Vibrio* by using the microplaque method.

The test of antioxydant activity of the strain SR1 extracts has been evolved and valued to $34, 11 \pm 0,287 \%$ by the DPPH method.

Key words: Marine Actinomycete, *Streptomyces*, antimicrobial activity, enzymatic activity, antioxydant activity, antibiofilm activity.