

F. Bousdira F. Bouf

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي  
République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

Université de Jijel

Faculté des Sciences Exactes et des Sciences  
de la Nature et de la Vie

Département de Biologie Moléculaire et  
Cellulaire



جامعة جيجل

كلية العلوم الدقيقة وعلوم الطبيعة والحياة

قسم البيولوجيا الجزيئية والخلوية

Mémoire de Fin d'Études pour l'Obtention du Diplôme de  
Master II en Biologie

Option : *Microbiologie Appliquée*

Thème :

# Isolement d'Actinomycètes producteurs de substances bioactives

Membres du Jury :

- **Président** : M<sup>me</sup>. Bousdira F.
- **Examineur** : Dr. Sifour M.
- **Encadreur** : M<sup>elle</sup>. Adjeroud N.

**Réalisé par :**

Deffas Nassira

Belemrabet Manal

Année Universitaire : 2010 - 2011



## REMERCIEMENTS

*Nous tenons à*

*Remercier premier lieu*

*Le dieu « ALLAH »*

*La personne qui nous à fait l'honneur de*

*Nous encadrer :*

*Melle : Nawal Adjeroud Pour tout ses effets*

*et ses*

*Conseils*

*Nous remercions les membres des jurys qui ont*

*Accepté de juger notre travail*

*Dr : Sifour M. et Mme : Bousdira F.*

*Nous exprimons notre profonde reconnaissance*

*à Nos parents De plus nous remercions nos*

*familles et toute personne*

*Ayant aidé de près ou de la réalisation de*

*Ce Travail A tous un grand et chaleureux*

*Merci*



# Dédicaces

*Dédicace :*

*Je dédie ce travail*

*À*

*Mes très chers parents*

*Laid et Aziza*

*Qui m'ont transmis le désir d'apprendre et m'ont toujours  
accompagné tout au*

*Long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur  
compréhension et leurs  
encouragements*

*À*

*Mes sœurs Et mes frères*

*Et à toute la famille*

*Nassira*

## ***Dédicaces***

***Je dédie ce modeste travail à :***

- ***Mes parents qui sont le soleil de ma vie***
- ***Les fleurs de son jardin mes sœurs et mes frères.***
- ***Tous mes amis***
- ***Tous mes collègues de la promotion de microbiologie appliquée.***

***À tous ceux que j'aime***

***MANAL.***

## SOMMAIRE :

Remerciements	
Dédicaces	
Introduction.....1	Analyse
bibliographique	

### CHAPITRE I : Généralités sur les actinomycètes

1-Définition des actinomycètes .....	2
2- Caractères morphologique .....	2
2-1- Mycélium du substrat.....	2
2-2 Mycélium aérien.....	2
2-3- La formation des spores.....	3
3 -Caractères physiologiques.....	3.
4- Ecologie.....	4
5- Classification des actinomycètes .....	4
6- Le genre <i>Streptomyces</i> .....	5
6-1- Généralités.....	5
6-2- Classification.....	6
6-3- Habitat.....	7
6-4- Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> .....	7
6-5- Caractères culturaux physiologiques .....	8
6-6- Le génome de <i>Streptomyces</i> .....	8
6-7- Pouvoir pathogène .....	9

### CHAPITRE II : Les substances bioactives

1-Intérêt industriel des actinomycètes .....	10
2-Le métabolisme des actinomycètes .....	10
3-Les antibiotiques.....	11
3-1- Définition.....	11
3-2- Principales familles d'antibiotiques et leurs Spectres d'activité.....	11
3-3- Mode d'action des antibiotiques.....	13
3-3-1- Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane.....	13
3-3-2- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines.....	13
3-3-3- Antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques ou inhibiteurs de la de synthèse l'acide folique.....	13
3-3-4- Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs.....	13
3-4- La résistance aux antibiotiques.....	14
3-4-1- Définition de la résistance et supports génétique.....	14
3-4-2- Modalité de résistance chez la bactérie.....	14
4-Les antifongiques.....	14
5- Effet de certains paramètres sur la production des antibiotiques.....	15
5-1- Influence des sources nutritionnelles.....	15
5-1-1- Effet de la source de carbone.....	15
5-1-2- Effet de la source d'azote.....	15
5-1-3- Effet des Oligoéléments.....	16
5-1-4- Facteurs physico-chimiques.....	16

## II . Matériel et Méthodes

1- Matériel.....	17
1-1 Echantillons du sol .....	17
1-2-Microorganismes indicateurs.....	17
a) Les bactéries.....	17
b) Les champignons et levures.....	17
1-3- Antibiotiques.....	17
.1-4-Antifongiques.....	17
1-5-Milieux de culture.....	17
1-6-Produits chimiques et réactifs.....	18
1-7-Appareillage et autres.....	18
2- Méthodes.....	18
2-1- Isolement des actinomycètes à partir du sol:.....	19
2-1-1- Prélèvement des échantillons.....	19
2-1-2- Mesure du pH du sol.....	20
2 -1-3- prétraitement des échantillons.....	20
2-1-4- Méthodes d'isolement.....	20
2 -2Caractérisationdes souches.....	20
2 -2-1- Observation microscopique.....	20
2-2-2- Coloration de Gram.....	20
2-2-3- Test à catalase.....	20
2-2-4- Réduction des Nitrates.....	21
2-2-5- Production d'indole.....	22

2-2-5- Recherche du tryptophane désaminase (TDA).....	21
2-2-6-Recherche de l'Urèase .....	21
2-2-7- Réduction des sulfates.....	21
2-2-7- La production de mélanine.....	21
3- Antibiogramme.....	21
4- Recherche de l'activité antimicrobienne des actinomycètes isolés.....	22
4-1- L'activité antibactérienne.....	22
4-1-1- Inocula des bactéries-tests.....	22
4-1-Technique des cylindres d'agar.....	22
4-2Recherche de l'activité antifongique et antilevurienne.....	22
4-3- Optimisation.....	23
4-3-1- Choix du milieu optimal de production.....	23
4-3-1-1-Culture des Streptomycètes à activité antibactérienne en milieu liquide.....	23
4-3-1-2- Mesure de la DO et du PH.....	23
4-3-1-3- Technique des disques.....	23
4-3-1-4- Technique des puits .....	23
4-3-2- pH du milieu de culture.....	23
 Résultats et discussion	
1-Résultats.....	24
1-1- Le PH du sol.....	24
1-2- L'isolement des actinomycètes.....	24
1-2-1- L'observation microscopique des isolats.....	24

1-2-2- L'observation macroscopique des isolats.....	25
1-2-3- Coloration.....	28
1-3- Les tests biochimiques.....	30
1-4- L'antibiogramme.....	31
1-5- Test d'activité antimicrobienne des isolats.....	31
1-5-1- Test d'activité antibactérienne des isolats.....	32
1-5-2- Test d'activité antifongique et antilevurienne des isolats.....	33
1-6- L'étude de l'influence de milieu de culture sur l'activité antimicrobienne.....	37
1-6-1- Cinétique de croissance des 3 souches isolées sur les deux milieux liquide kuster et Bennett.....	37
1-6-2- L'activité antibactérienne des souches isolées sur les deux milieux liquides kuster et Bennett.....	40
1-6- L'étude de l'influence du PH de milieu de culture sur l'activité antimicrobienne.....	41
2-Discussion.....	43
Conclusion.....	50
Références .....	51

## Liste des tableaux

<b>Tableau n° 1</b> : la classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr/ ARNr 16S .....	<b>5</b>
<b>Tableau n° 2</b> : Les principales différences entre les métabolites primaires et secondaires.....	<b>11</b>
<b>Le tableau n° 3</b> : représente principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité.....	<b>12</b>
<b>Tableau n° 4</b> : L'antifongique efficace contre des cellules eucaryotes (Perry et al, 2004).....	<b>15</b>
<b>Tableau n° 5</b> :l'aspect macroscopique des colonies des souches d'actinomycètes isolées.. .....	<b>25-26</b>
<b>Tableau n° 6</b> : Résultats des tests biochimiques.....	<b>30</b>
<b>Tableau n° 7</b> : Résultats de l'antibiogramme réalisé contre les souches tests utilisés.....	<b>31</b>
<b>Tableau n° 8</b> : Résultat de l'activité antibactérienne des isolats.....	<b>32</b>
<b>Tableau n° 9</b> : Résultat de l'activité antifongique et antilevurienne des isolats.....	<b>34</b>
<b>Tableau n° 10</b> : Les valeurs des DO maximales des deux milieux Kuster et Bennett ensemencés par les 3 souches isolées.....	<b>39</b>
<b>Tableau n° 11</b> : Diminutions maximales de pH des deux milieux Bennett et Kuster ensemencés par les 3 souches isolées.....	<b>39</b>
<b>Tableau n° 12</b> : Résultats de l'activité antibactérienne des souches isolées sur les deux milieux liquides kuster et bennett.....	<b>40</b>
<b>Tableau n° 13</b> : Résultats de l'activité antibactérienne des souches isolées sur milieu Bennett à différent pH; 5.5, 7 et 7.5.....	<b>41</b>

## Liste des figures

<b>Figure n° 1</b> : Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide.....	<b>2</b>
<b>Figure n° 2</b> : Les différentes formes de spores.....	<b>3</b>
<b>Figure n° 4</b> : Classification des <i>Streptomyces</i> .....	<b>6</b>
<b>Figure n° 5</b> : Cycle de vie de <i>Streptomyces</i> .....	<b>7</b>
<b>Figure n° 6</b> : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.....	<b>8</b>
<b>Figure n° 7</b> : Origine des produits microbiens bioactifs.....	<b>10</b>
<b>Figure n° 8</b> : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques.....	<b>13</b>
<b>Figure n° 9</b> : Interconversion des molécules azotées dans le métabolisme central de l'azote chez <i>Streptomyces</i> .....	<b>16</b>
<b>Figure n° 10</b> : relation entre la croissance de la souche A13 et le pH de milieu .....	<b>37</b>
<b>Figure n° 11</b> : relation entre la croissance de la souche A16 et le pH de milieu.....	<b>38</b>
<b>Figure n° 12</b> : relation entre la croissance de la souche A19 et le pH de milieu.....	<b>38</b>

## Liste des photographies

<b>Photographie n° 1 :</b> Site de prélèvement (Parc de Taza).....	<b>19</b>
<b>Photographie n° 2 :</b> Prélèvement des échantillons.....	<b>19</b>
<b>Photographie n° 3 :</b> Apparition de colonies après isolement sur milieu Kuster-amidon.....	<b>24</b>
<b>Photographie n° 4 :</b> Représentations photographiques des principaux actinomycètes isolés.... .....	<b>27-28</b>
<b>Photographie n° 5 :</b> Aspect filamenteux de la souche A5 après coloration de Gram et observation microscopique au grossissement G×100.....	<b>29</b>
<b>Photographie n° 6 :</b> Formation de spores : observation microscopique au grossissement G×100 après coloration de Gram.....	<b>29</b>
<b>Photographie n° 7 :</b> Activités antibactériennes des souches.....	<b>35</b>
<b>Photographie n° 8 :</b> Activités antifongiques des souches isolées.....	<b>36</b>
<b>Photographie n° 9 :</b> Activités antilevuriennes des souches isolées.....	<b>36</b>
<b>Photographie n° 10 :</b> Coloration verte dans le flacon à gauche par rapport au témoin du milieu Bennett.....	<b>41</b>
<b>Photographie n° 11 :</b> Zone d'inhibition de la souche A16 contre la <i>SARM</i> à pH 5,5.....	<b>42</b>

## Liste des abréviations :

ADN : Acide Désoxyribonucléiques

ARN : Acide Ribonucléique

ARNr : Acide Ribonucléique Ribosomique

DO : Densité Optique

CMI : Concentration Minimal Inhibitrice

G : Guanine

C : Cytosine

C° : Degré Celsius

% : Pourcentage

ATCC : American Type Culture Collection

h : heure

g : gramme

L : Litre

Mm : millimolaire

S. : *Streptomyces*

µg : microgramme

ml : millilitre

pH : potentiel d'Hydrogène.

ISP: International Streptomyces Product

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikro-organismen und Zellkulturen GmbH. (German Collection of Microorganisms and Cell Cultures).

# *Introduction*

### **Introduction :**

Le développement de la résistance à plusieurs médicaments est un important problème dans le traitement des infections causées par des micro-organismes pathogènes (Mehdi *et al.*, 2006). Pour combattre ces microorganismes pathogènes, plusieurs travaux de recherche sont actuellement orientés vers la découverte de nouvelles molécules bioactives, à savoir des antibiotiques, des antifongiques et des bactériocines, pour des applications pharmaceutiques, agricoles (remplacement des pesticides chimiques par des molécules bioactives naturelles) et agro-alimentaires (Zermane, 2007).

Les molécules bioactives sont des métabolites secondaires non essentiels pour la croissance et la reproduction, mais pour le micro-organisme producteur ils forment sans doute un mécanisme de défense pour rivaliser dans la nature (Ben Ameer *et al.*, 2006)

En pratique, il est prouvé que la capacité de produire différents composés est limitée à des groupes de microorganismes eucaryotes et de bactéries (Zerizer *et al.*, 2006). Une large gamme de métabolites secondaires importants, y compris les antibiotiques, les herbicides et les stimulateurs de croissance, sont produits par plusieurs membres d'actinomycètes.

Le genre *Streptomyces* est le plus important genre d'actinomycètes produisant les antibiotiques, plus de 60% des près de 6000 antibiotiques d'origine microbienne sont produites par *Streptomyces spp.*, y compris les agents antibactériens et antifongiques et un nombre considérable d'autres composés bioactifs tels que les immunosuppresseurs et les agents anticancéreux (Yang *et al.*, 2011).

Pour cette raison les métabolites des actinomycètes continuent d'être une source importante de recherche de nouveaux antibiotiques, enzymes et d'autres produits bioactifs.

L'objectif principal de ce projet est l'isolement de bactéries filamenteuses à partir du sol, appartenant au groupe des actinomycètes, de mettre en évidence leurs capacités à produire des substances antibactériennes, antifongiques et antilevurienne. Et d'étudier l'effet du milieu de culture et du pH sur certaines souches représentatives ayant montré une importante activité contre les microorganismes testés.

*Analyse bibliographique*

*Chapitre I*  
*Généralités sur les*  
*Actinomycètes*

### 1-Définition des Actinomycètes et caractères généraux

Les actinomycètes forment un grand groupe de microorganismes procaryotes appartenant à l'ordre des Actinomycétales (Bouras, 2005). Ils ont durant de longues années, été comparés et rapprochés à des champignons à cause de l'aspect de leurs colonies et en raison de leur croissance mycélienne (Leclerc, 1994).

Les actinomycètes sont des bactéries à coloration de Gram-positif et dont le coefficient de Chargaff (G+C%) est supérieur à 55% généralement compris entre 60 à 70% (Kitouni, 2007), pouvant former des hyphes à l'un de leur stade de développement (Lefebvre, 2008).

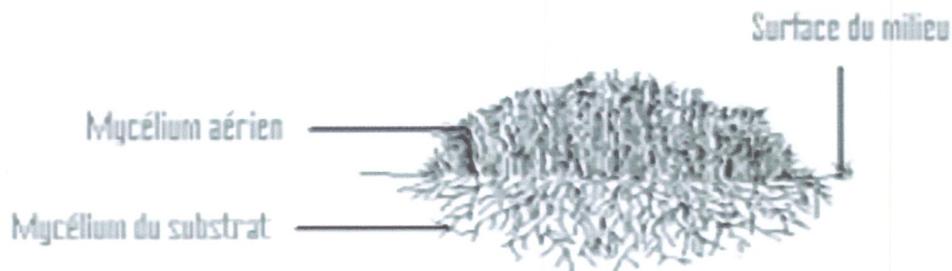
Le diamètre des filaments des formes mycéliennes est toutefois environ deux fois plus faible (0,5 à 1,2  $\mu\text{m}$ ) que celui des mycéliums de champignons (Roger et Garcia, 2001).

### 2- Caractères morphologiques

La diversité morphologique est un caractère tout à fait remarquable des actinomycètes.

Cette diversité morphologique se traduit le plus souvent par une différenciation importante et l'existence d'un cycle biologique semblable à celui de certains eucaryotes (Leveau et Buix, 1993).

La majorité des actinomycètes cultivés sur milieu solide forment un mycélium de substrat et un mycélium aérien (Figure 1). Néanmoins, il existe des groupes qui ne forment qu'un mycélium de substrat poussant à la surface et dans le milieu de culture ou un mycélium aérien dont les hyphes sont attachés au milieu par des crampons (Aouar, 2006)



**Figure n° 1** : Croissance d'une colonie d'actinomycètes sur milieu solide (Zermane, 2007)

#### 2-1- Mycélium du substrat

Quand les spores ou les propagules des actinomycètes sont inoculées dans un milieu solide sous des conditions favorables, elles germent rapidement, souvent au bout de 2 à 6h, pour former des hyphes qui se ramifient intensément pour donner naissance à un mycélium (Ouhdouch, 2003).

Le mycélium du substrat ou primaire est ancré dans le support solide ou il puise ses nutriments (Zermane, 2007).

#### 2-2- Mycélium aérien

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire composé d'hyphes, dressés sur le mycélium du substrat (Kitouni, 2007). Le mycélium aérien montre une pigmentation variable: blanche, grise, jaune, orange, rouge, rose, violette, bleue, verte,...etc (Ouhdouch, 2003).

### 2-3- La formation des spores

Beaucoup d'Actinomycètes sont capables de former des spores, qui peuvent survivre à des conditions défavorables (Zaitlin et Watson, 2006), habituellement en réponse à une privation en éléments nutritifs (Prescott *et al.*, 2000). Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation: exospores et endospores. Les exospores sont formées par septation d'hyphes existants et séparation des éléments obtenus (Leveau et Buix, 1993).

Les endospores naissent d'une réorganisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces*. (Kitouni, 2007).

Les spores peuvent suivant le groupe, être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales en longues chaînettes (*Streptomyces*) comme (Ouhdouch, 2003), présentée dans la figure ci-dessous:

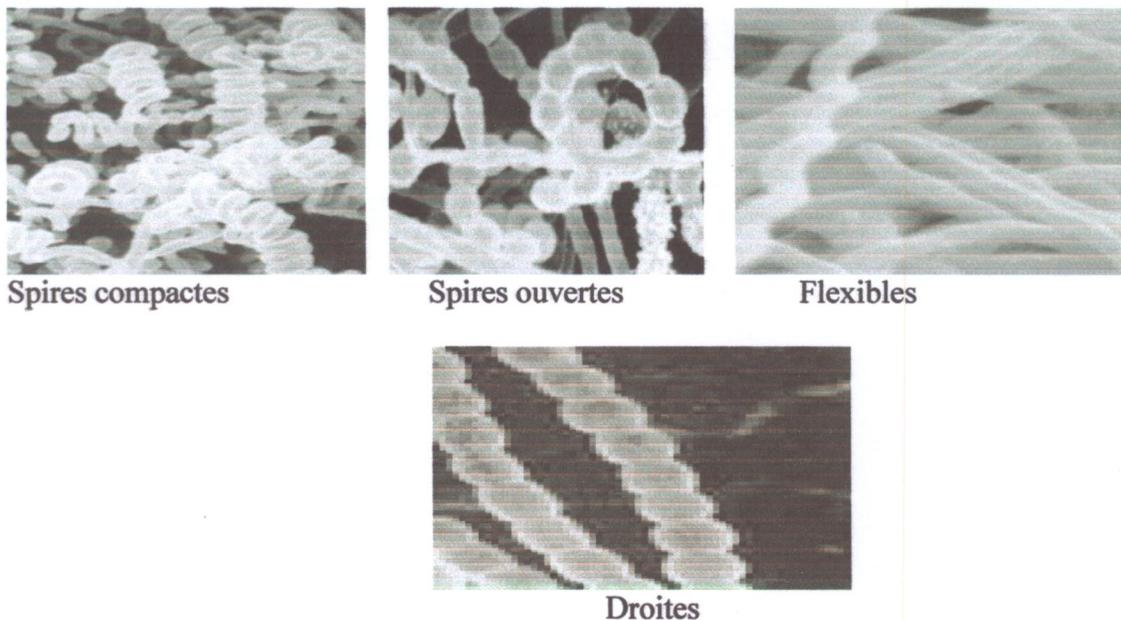


Figure n° 2 : Les différentes formes de spores (Zermane, 2007)

### 3- Caractères Physiologiques

Physiologiquement, il existe deux groupes d'actinomycètes:

En premier lieu, les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, illustrées par le genre *Actinomyces*. En second lieu, les formes oxydatives, aérobies, tels que les *Streptomyces* (Aouar, 2006).

Les actinomycètes sont des eubactéries chimio-organotrophes hétérotrophes (Bouras, 2005), mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe (Zermane, 2007). Les actinomycètes sont des microorganismes mésophiles. Cependant, il existe des espèces thermophiles, principalement dans le genre thermoactinomyces dont la température optimale est entre 50 et 60°C (Djaballah, 2010).

#### 4-Ecologie

L'écologie de ces bactéries n'est pas bien comprise (Zaitlin et Watson, 2006). Les actinomycètes sont des microorganismes très ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants (Leveau et Buix, 1993). Ils sont présents dans des sols polaires gelés en permanence comme dans des sols désertiques, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés (Lefebvre, 2008).

Une majorité d'actinomycètes sont saprophytes mais ils existent des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (Kitouni, 2007), ils comprennent des agents pathogènes humains tels que *Actinomyces israelii*, une des principales causes de la carie dentaire (Zaitlin et Watson, 2006). Les actinomycètes constituent une portion importante de la population microbienne dans la plupart des sols (Polti *et al.*, 2007).

Leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries, ils se développent relativement bien sur une matière organique partiellement dégradée (Roger et Garcia, 2001).

Ils prolifèrent surtout quand l'action des bactéries ordinaires touche à sa fin, on pourrait dire qu'ils terminent leur action (Laureti, 2010).

#### 5-Classification des Actinomycètes

En 1970, Lechevalier MP, Lechevalier HA proposent une classification des actinomycètes fondée sur des caractères morphologiques et chimiques qui permet de grouper les actinomycètes en genres faciles à caractériser. Les critères chimiques utilisés utilisent surtout la nature de leurs parois cellulaires et des lipides (Lefebvre, 2008).

En 1997, Stackebrandt *et al.* proposent une nouvelle classification hiérarchique des actinomycètes qui repose uniquement sur l'analyse des séquences des ARNr 16S et des gènes codant pour les ARNr 16S. En effet, leur classification basée sur des caractéristiques morphologiques, chimiotaxonomiques ou physiologiques, a été vérifiée pendant ces 20 dernières années, et il s'est avéré qu'elle est en accord avec le regroupement phylogénétique basé sur l'ADNr/ARNr 16S (Tableau n° 3) (Aouar, 2006).

Les Actinobacteria comprennent 5 sous classe : *Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae*, *Actinobacteridae*.

Les *Acidimicrobidae* se subdivisent en *Actinomycétales* et *Bidiodobactériaes*

Les *Actinomycétales* l'ordre le plus important, regroupe 10 sous ordres :

*Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Psuedonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankinea*, *Glycomycineae* (Larpen, 2002).

**Tableau n°1** : la classification hiérarchique de la classe Actinobacteria basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr/ ARNr 16S (Garrity et al., 2004).

Phylum <i>Actinobacteria</i>					
Classe <i>Actinobacteria</i>					
S/C	<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteridae</i>	<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
S/C	<i>Actinobacteridae</i>				
Ordres	<i>Bifidobacteriales</i>		<i>Actinomycetales</i>		
Ordre <i>Actinomycetales</i>					
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococcineae</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Micromonosporineae</i>	<i>Propionibacterineae</i>	
Famille	Familles	Familles	Famille	Familles	
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	<i>Micromonosporineae</i>	<i>Propionionibacteriaceae</i> <i>Nocardioideaceae</i>	
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	
<i>Pseudonocardinea</i>	<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptosporangineae</i>	<i>Frankinea</i>	<i>Glicomycineae</i>	
Familles	Famille	Familles	Familles	Famille	
<i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosoriaceae</i>	<i>Glicomycetaceae</i>	

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

## 6- Le genre *Streptomyces*:

### 6-1- Généralités:

Le genre *Streptomyces* (du grec *Streptos*: courbé, tordu et *Mycos*: moisissure) appartient au groupe des Streptomycètes (Colombié, 2005). Ce genre a été proposé par Waksman et Henrici dans (1943). Ils sont bien connus comme une riche source d'antibiotiques et de molécules bioactives (Nekpen et Ogunmwonyi, 2010). Elles sont des aérobies stricts, ayant une paroi de type I (LLDAP) et formant des chaînes de spores non mobiles dans un fin fourreau fibreux (Zouaghi, 2007).

Les *Streptomyces* représentent le genre majoritaire des *Streptomycètes* (95,34 %). Il s'agit de bactéries du sol filamenteuses, dont les hyphes, de longueur variable, ont un diamètre compris entre 0,5 et 2,0 $\mu$ m (Saffroy, 2006).

Les hyphes aériens se divisant en un seul plan pour former des chaînes de 5 à 50 conidiospores non mobiles dont la texture superficielle varie du lisse à l'épineux et aux verruqueux (Prescott, 1995). Ces bactéries saprophytes produisent diverses enzymes extracellulaires impliquées dans la dégradation, de nombreuses macromolécules issues des plantes et des animaux (chitine, pectine, amidon, kératine, élastine, etc....)(Desjardin, 2002).

### 6-2- Classification

Le genre *Streptomyces* sont des eubactéries appartiennent à la famille *Streptomycetaceae*, *Ordre Actinomycetales*, *Phylum Actinobacteria*, et comprend les espèces suivantes comme montre la figure 4.

*S. achromogenes*, *S. ambofaciens*, *S. aureofaciens*, *S. avermitilis*, *S. clavuligerus*, *S. coelicolor*, *S. felleus*, *S. ferralitis*, *filamentosus S.*, *S. griseus*, *S. hygroscopicus*, *S. iysosuperficus*, *S. lividans*, *S. noursei*, *S. scabies*, *S. somaliensis*, *S. thermoviola*, *S. toxytricini*, *S. tsukubaensis*, *S. venezuelae*, *S. violaceoruber*, et plus de 500 espèces supplémentaires (Nekpen et Ogunmwoyi, 2010).

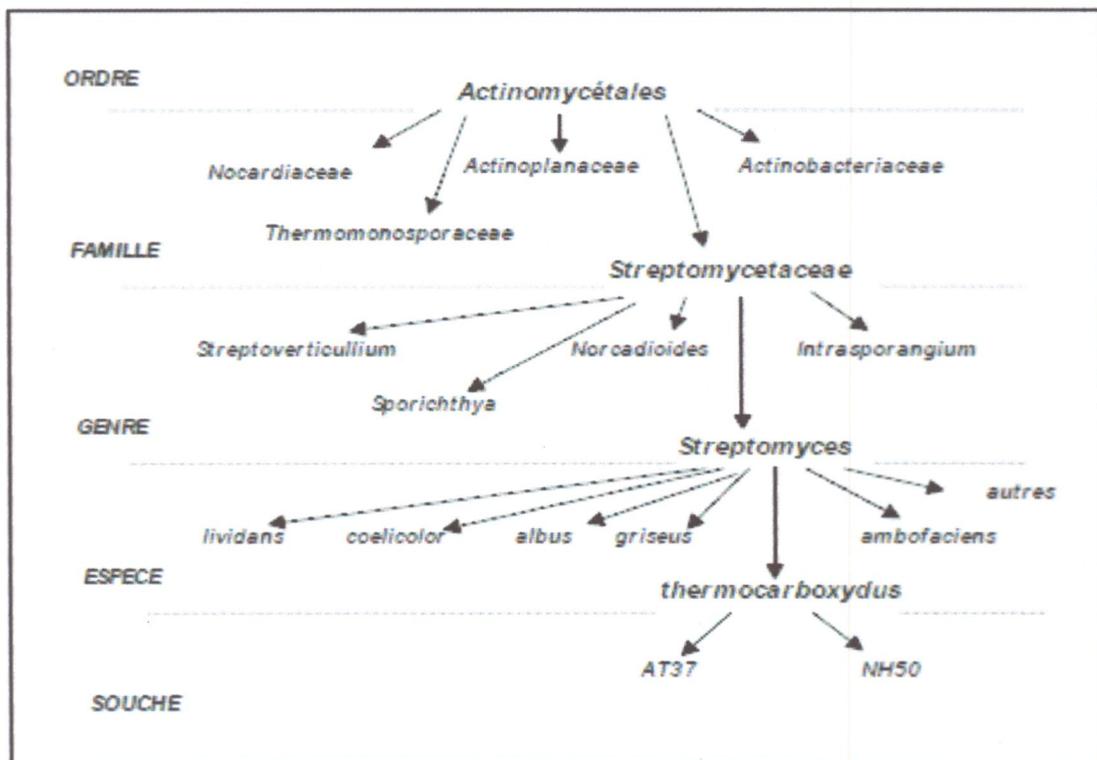


Figure n° 4 : Classification des *Streptomyces* (Desjardin, 2002).

### 6-3- Habitat

Les *Streptomyces* sont bactéries ubiquistes, le sol c'est leur réservoir principal et à partir duquel elles sont disséminées, en particulier dans l'air. Dans ce dernier, les spores sont considérées comme des contaminants (Aouar, 2006). Elles sont facilement isolées, des eaux douces et spécialement des sédiments des rivières et des lacs et par foie Isolés à partir du lessivage des sols. Leurs développement est possible sur les matières végétales en décomposition, la multiplication de certaines espèces engendre des goûts de terre ou de moisi qui sont dues à certains métabolites comme la géosmine (Leclerc, 1994).

### 6-4- Cycle de développement des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* ont un cycle de vie complexe autant qu'*E. Coli* (Von et Dangel, 2002). Très souvent, on considère qu'une colonie bactérienne est un ensemble de bactéries toutes identiques entre elles puisque qu'elles dérivent par scissiparité d'un clone isolé). Dans le cas des *Streptomyces*, on observe des colonies formées de cellules qui n'ont pas la même morphologie. Elles sont pourtant issues du même clone initial. Cette particularité est le résultat d'une différenciation morphologique par étapes successives comme présentée dans la( figure 5).

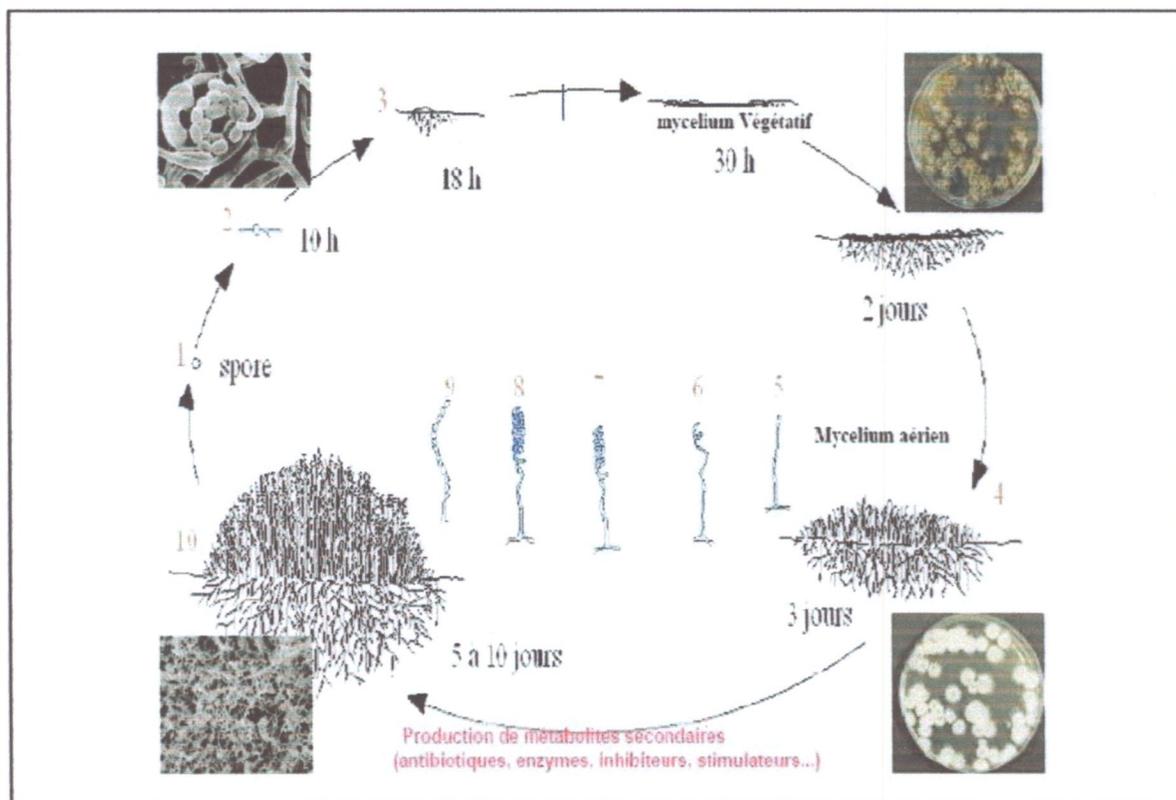
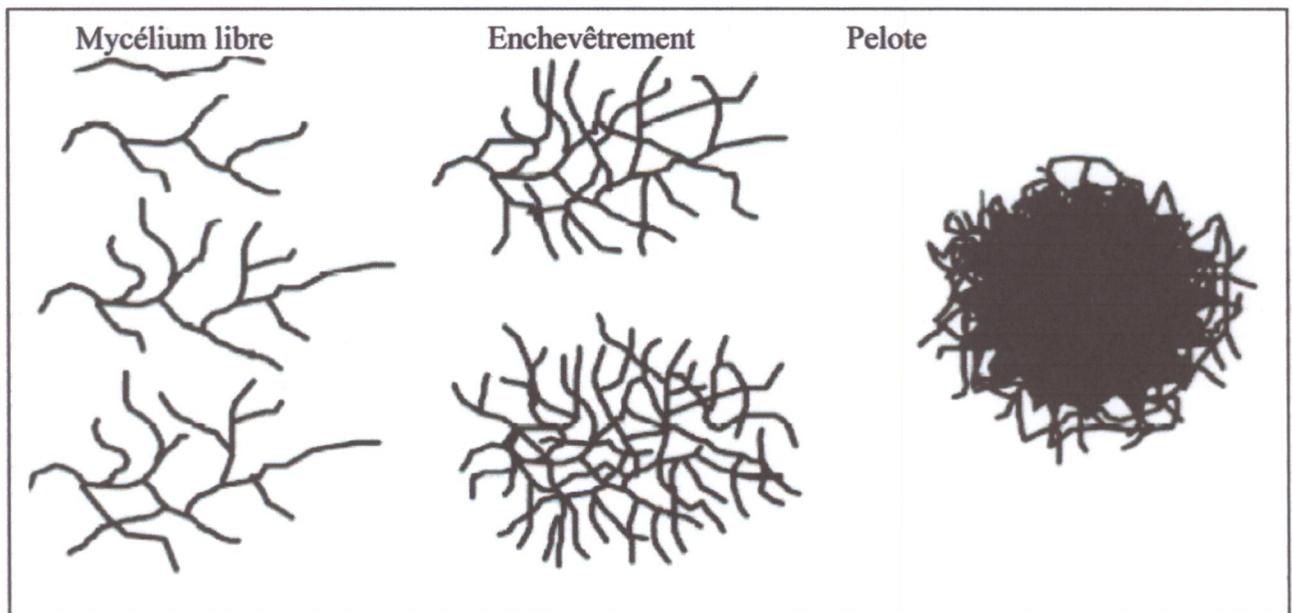


Figure n° 5: Cycle de vie de *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985).

La germination d'une spore, sur milieu solide, donne d'abord naissance à un mycélium basal. Celui-ci «s'incruste» dans le milieu de croissance par action d'enzymes hydrolytiques synthétisées par les cellules (Desjardin, 2002).

Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. En effet ce dernier s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien (Smaoui, 2010). Ces structures vont développer des torsades, tel un tire-bouchon. Leur partie terminale, après une série de réplifications et de migrations du chromosome bactérien, montre l'apparition d'un nombre important d'événements de septation, qui sont à la base de la formation d'autant de jeunes cellules bactériennes qui vont, après maturation et libération, donner naissance à de nouvelles formes libres, pour que le cycle vital recommence (Colombié, 2005).

Les *Streptomyces* au cours de cultures liquides, croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter trois types de morphologie comme illustré dans la figure 6: les hyphes, branchées ou non, sous forme de mycélium plus ou moins ramifiée formant des enchevêtrements ou encore des pelotes denses dont la Taille peut varier de 0.1 $\mu$ m à plusieurs millimètres, ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries se trouvant à l'intérieur de la pelotes. La croissance en milieu liquide nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air ou d'oxygène puisque ces bactéries sont aérobies strictes (Saffroy, 2006).



**Figure n° 6:** Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al*, 2000).

#### 6-5- Caractères cultureux et physiologiques

Les *Streptomyces* peuvent utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. La température optimale de croissance se situe entre 25 et 35°C. Ce sont en majorité des souches mésophiles, mais il existe quelques souches psychrophiles ou thermophiles. La gamme de pH optimale est comprise entre 6,5 et 8,5 (Saffroy, 2006), les colonies sont de grande taille souvent pigmentées et d'aspect fongique (Larpen, 2000). Les colonies sont de grande taille souvent pigmentées et d'aspect fongique (Larpen, 2000).

**6-6- Le génome de *Streptomyces***

Les caractéristiques génomiques des *Streptomyces* sont tout aussi originales dans la mesure où tous les génomes caractérisés de *Streptomyces* se composent d'un chromosome linéaire de grande taille (8,7 Mb pour *S. coelicolor*, 10,1 Mb pour *S. scabies*) avec un pourcentage très élevé en bases G+C (71% à 73%). De plus, certaines espèces peuvent posséder des plasmides linéaires et/ou Circulaires (Choulet, 2006).

**6-7- Pouvoir pathogène**

Les streptomycètes ont pour la plupart un comportement de sporophytes non pathogène mais quelques uns sont pathogènes des plantes et d'animaux ou *Streptomyces scabies* provoque la maladie de la gale chez la pomme de terre et la betterave. *Streptomyces somaliensis* est le seul streptomycète pathogène connu chez l'homme, il est associé aux actinomycitoses, une infection des tissus sous-cutanés responsables de lésions engendrant des gonflements et des abcès (Prescott *et al.*, 2003).

## *Chapitre II*

### *Les molécules bioactives*

### 1- Intérêt industriel des actinomycètes

Parmi les genres d'actinomycète, les *Streptomyces* sont largement reconnus comme des micro-organismes industriels importants, due à leur capacité à produire beaucoup de genres de métabolites secondaires (Ceylan *et al*, 2008).

Notamment, plus des deux tiers des antibiotiques utiles d'origine naturelle sont produites par *Streptomyces*. Jusqu'à présent, plus de 3000 composés biologiquement actifs ont été isolés à partir *Streptomyces* (y compris les antibiotiques importants comme les tétracyclines, la vancomycine et érythromycine). Au vaste ensemble des antibiotiques il faut ajouter d'autres applications industrielles comme les productions d'enzymes (Cellulase, Tyrosine hydroxylase...), de nucléotides, et de certaines vitamines (Dangl, 2009).

Les *Streptomyces* sont très étudiés pour leur propriété à synthétiser des antifongiques des antitumoraux (mitomycine, actinomycine...), des antiparasitaire (hygromycine, salinomycine...), des antiviraux (tunicamycine...), des insecticides (avermectine, milbémecine) et des herbicides (bialpho) ( Desjardin, 2002).

### 2- Le métabolisme des actinomycètes

Le métabolisme des actinomycètes peut être divisé en deux parties: le métabolisme primaire et le métabolisme secondaire.

Le métabolisme primaire regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse. Le pouvoir réducteur et l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex: acides aminés) en macromolécules (ex: protéine).

Le métabolisme secondaire regroupe les voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonction apparente dans le métabolisme cellulaire (Strub, 2008).

Le médecin allemand Bu'Lock introduit pour la première fois le terme métabolite secondaire pour définir les produits métaboliques qui découlent de la différenciation morphologiques des bactéries de l'ordre des Actinomycétales et des champignons (Laureti, 2010).

Les propriétés de métabolite primaire et secondaire sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés et sont résumées dans le tableau n° 2 (Saffroy, 2006).

**Tableau n° 2:** Les principales différences entre les métabolites primaires et secondaires (Saffory, 2006).

<b>Métabolite primaire</b>	<b>Métabolite secondaire</b>
<p>Synthétisé pendant la trophophase . Présent tout au long du cycle cellulaire. Nécessaire à la croissance. Rôle physiologique connu. Produit dans des conditions de culture. Diverses.</p> <p>Ubiquitaire Enzymes à spécificité étroite. Voies de synthèse simple et courte. Structure chimique généralement simple. Concentration élevée. Turn-over élevé.</p>	<p>Synthétisé pendant l'idiophase. Apparition à un moment du cycle cellulaire Inutile pour la croissance. Rôle physiologique mal connu. Produit dans des conditions de culture bien définies.</p> <p>Spécifique. Enzymes à spécificité large. Voies de Synthèse longue et complexe. Structure chimique souvent complexe. Concentration faible. Turn-over pratiquement nul.</p>

### 3- Les antibiotiques

#### 3-1- Définition

Un antibiotique est une substance antibactérienne d'origine biologique, c'est à dire produite par des micro-organismes (champignons microscopiques et bactéries) ou de synthèse chimique et qui est capable d'inhiber la multiplication ou de détruire d'autres micro-organismes (Yala *et al.*, 2001) . Les antibiotiques synthétiques sont obtenus soit à partir de dérivés artificiels, soit en recréant des substances primitivement extraites de microorganismes. Les antibiotiques semi synthétiques sont obtenus en modifiant en laboratoire une substance produite par un micro-organisme (Ben Ali, 2007).

#### 3-2- Principales familles d'antibiotiques et leurs Spectres d'activité

La classification des antibiotiques est nécessaire pour faciliter le choix thérapeutique car le nombre de molécules est élevé. Le tableau 3 représente les principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité .

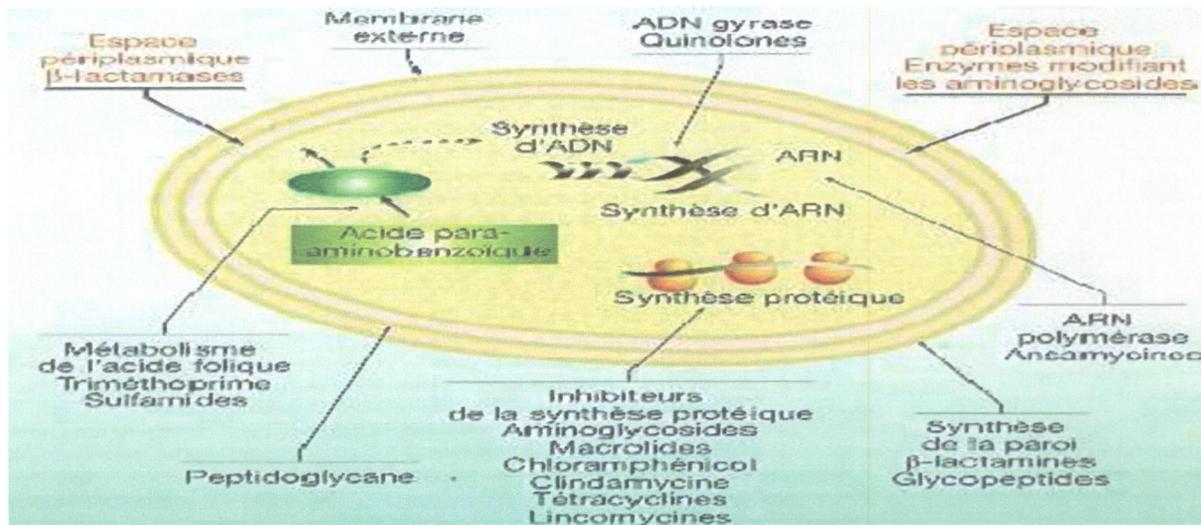
**Tableau n° 3** : principales familles d'antibiotiques et leurs spectres d'activité  
(Ben Ali, 2007)

Familles	Date de la découverte	Spectre
Les Sulfamides	1938 par Domagk (Prix Nobel en 1938)	Large spectre d'action chez les bactéries à Gram (+) et Gram (-).
Les Beta-lactamines Pénicilline	<ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Pénicilline : Fleming en 1928.</li> <li>➤ Produite à large échelle en 1942 aux EU.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- la pénicilline G et V sont très efficaces contre les souches sensibles de coques à G (+), inefficaces contre la plupart des S.aureus.</li> <li>- l'ampicilline, l'amoxicilline, la bacampicillines ont une activité qui s'étend aux bactéries Gram (-).</li> </ul>
Les Beta-lactramines Céphalosporine	Identifiée par Brotzu en 1948.	- Des produits à large spectre, surtout les bacilles à G (-).
Aminosides ou aminoglycosides.	Waksman et coll.  1943 : streptomycine  1949 : néomycine  1957 : kanamycine	<ul style="list-style-type: none"> <li>- la gentamycine, la nétilmicine, la tobramycine : large spectre contre les bactéries à G (-) aérobies.</li> <li>- la kanamycine et la streptomycine : spectre plus limités, inefficaces contre P.aeruginosa.</li> <li>- la gentamycine et la tobramycine large spectre contre les S.aereus.</li> </ul>

Les Tétracyclines	1948 : la chlortétracycline par streptomyces aureofaciens et l'oxytétracyclines par S.rimosus.	- Large spectre d'activité contre les bactéries à G (+), G (-), aérobies, anaérobies.
Les chloramphénicols	1947 : par streptomyces venezulae.	- large spectre d'action des chez les bactéries à G (+) et à G (-).
Les Macrolides (Erythromycine, clarithromycine, arithromycine).	Mc Guire, 1952 : l'érythromycine, la clarithromycine et l'azithromycines sont des dérivés semi-synthétiques de l'érythromycine.	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Efficace contre les coques et les bacilles aérobies à G (+). Ex : S.pyogenes et S.pneumocine.</li> <li>- Actif contre de nombreux bacilles à G (-). Ex Clostridium perfringens, listeria monocytogène.</li> </ul>

### 3-3- Mode d'action des antibiotiques

Les quatre différents modes d'actions sont montrés dans la (Figure n° 7).



**Figure n° 8 :** Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (Davies et Mazel, 1997).

#### 3-3-1- Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques (ex: les pénicillines, les céphalosporines, la vancomycine et la bacitracine) inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram+ et à Gram- (Smaoui, 2010).

#### 3-3-2- Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Les antibiotiques de cette catégorie les plus importants en médecine sont les Aminosides, les macrolides, les tétracyclines et la rifampicine. La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien. Il faut donc, pour toutes ces molécules, traverser le peptidoglycane et les diverses membranes pour arriver dans le cytoplasme et atteindre leur cible: le ribosome (Prescott *et al.* 2003).

#### 3-3-3- Antibiotiques inhibiteurs des voies métaboliques ou inhibiteurs de la synthèse de l'acide folique

Des exemples peuvent être cités tels que: les sulfamides qui agissent sur la synthèse de l'acide folique, un cofacteur de la synthèse des bases puriques et pyrimidiques à incorporer dans les acides nucléiques. Et les diaminopyridines inhibant la réduction de l'acide folique en tirant partie de la différence de sensibilité de la dihydrofolate réductase bactérienne par comparaison avec l'enzyme des cellules eucaryotes (Berlin, 2002).

#### 3-3-4- Antibiotiques actifs sur le métabolisme des acides nucléiques et de leurs précurseurs

On distingue des antibiotiques actifs d'une part sur la synthèse des ARN et d'autre part sur la synthèse des ADN ou de leurs précurseurs. La Rifamycine agit en bloquant l'ARN polymérase. Les Quinolones inhibent la synthèse de l'ADN de la bactérie en se fixant sur le complexe "ADN-ADN gyrase" en empêchant la réplication et la transcription de l'ADN bactérien (Yala *et al.*, 2001).

### 3-4- La résistance aux antibiotiques

#### 3-4-1- Définition de la résistance et supports génétiques

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, puis pénétrer dans la cellule afin de se fixer à une cible et perturber le fonctionnement du microorganisme, sans être détruit ni modifié. Si l'antibiotique ne parvient pas à pénétrer dans la bactérie ou à se fixer sur une cible, il devient inefficace. Ce phénomène appelé résistance

. La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique peut être :

- **Intrinsèque** : l'espèce est alors caractérisée par son insensibilité naturelle à un antibiotique particulier. Cela peut résulter de l'incapacité de l'antibiotique à pénétrer dans la cellule (paroi bactérienne imperméable) et à atteindre sa cible, d'un manque d'affinité entre l'antibiotique et son site d'action, ou de l'absence de cible cellulaire.
- **Acquise** : l'espèce est normalement sensible à un antibiotique mais certaines souches expriment une résistance à un ou des antibiotique(s) donné(s) grâce à plusieurs mécanismes biochimiques. Elles sont donc capables de supporter une concentration d'antibiotique(s) qui normalement est suffisante pour inhiber ou tuer des bactéries de la même espèce (Delery, 1999).

#### 3-4-2- Modalité de résistance chez la bactérie

- **Le brouillage** : la bactérie synthétise des protéines qui peuvent séquestrer l'antibiotique Ou le dégrader pour le rendre inoffensif (hydrolases, transférases...). Ce brouillage peut se faire à l'extérieur (bêta-lactamase) de la cellule Comme à l'intérieur.
  - **Le camouflage** : la bactérie peut modifier la cible de l'antibiotique. Celle-ci n'est pas reconnue et devient insensible à l'antibiotique.
- **Le blindage** : la bactérie empêche l'accès de l'antibiotique aux cibles intracellulaires soit par modification de la perméabilité membranaire, soit par la mise en place d'un système d'expulsion de l'antibiotique ce qui résulte que la pompe membranaire refoule l'antibiotique qui entre dans la cellule (Ben Ali, 2007).

### 4- Les antifongiques

Les antifongiques sont des molécules bioactives utilisées contre les champignons (Smaoui, 2010).

Les antifongiques d'origine microbiologique utilisés actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyénique, notamment l'amphotéricine B et la nystatine. Certains polyènes comme la pimarinine (ou natamycine) sont cependant aussi utilisés en Alimentation animale, de par l'absence générale de résistance naturelle aux antifongiques de ce type. Les antifongiques de structure non-polyénique sont surtout représentés par la griséofulvine, active Sur les dermatopytes. D'autres substances non-polyéniques, telles que le cycloheximide, l'azalomycine F ou la saramycétine (Bastide et al ., 1986). Le polykétide nystatine, produit par *Streptomyces noursei* est utilisé comme antifongique pour lutter contre les infections causées par *Candida albicans* (Chorin, 2009).

Le tableau<sup>o</sup> 4 représente certains substances antifongiques produite par les *Streptomyces* .

**Tableau 4 :** L'antifongique efficace contre des cellules eucaryotes (Perry et al, 2004).

<b>Organisme producteur</b>	<b>Substrat produit</b>
<i>Streptomyces griseus</i>	<b>Antifongique</b> Cycloheximide
<i>Streptomyces moursei</i>	Nystatine
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine

### **5- Effet de certains paramètres sur la production des antibiotiques**

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions. Premièrement, il est nécessaire d'avoir des usines cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; deuxièmement, les précurseurs doivent être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présentes et actives (Bouras, 2005).

#### **5-1- Influence des sources nutritionnelles**

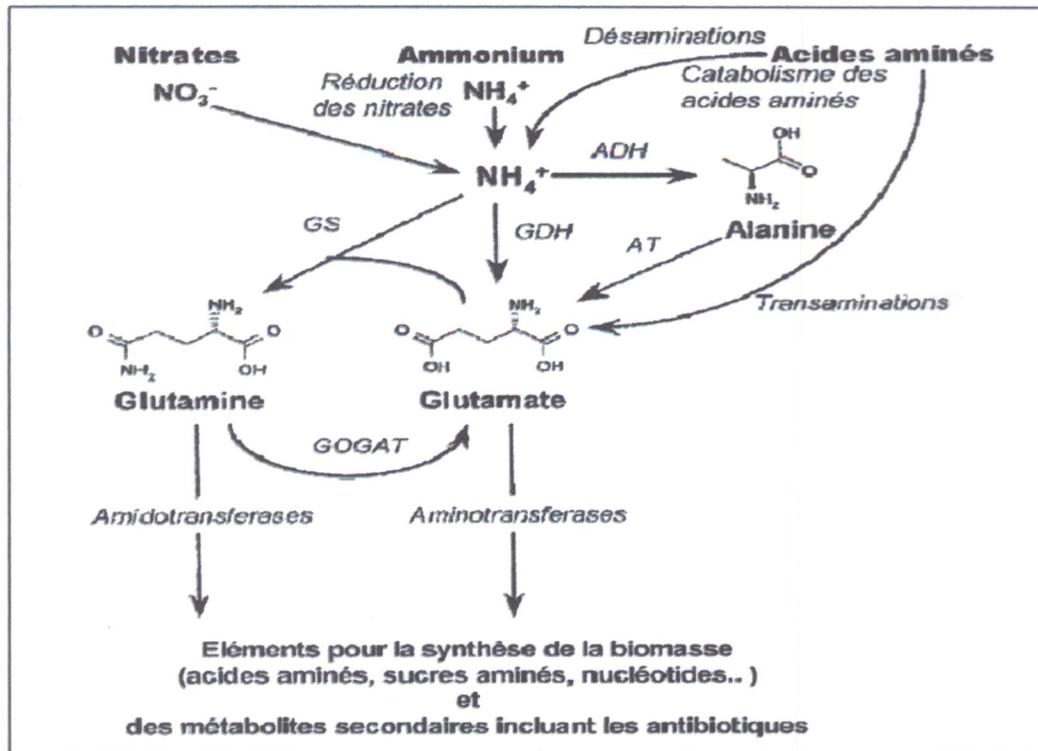
Les différentes composantes du milieu de culture ont montré une grande influence sur la production de métabolites secondaires, entre autres chez les actinomycètes. Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement cette production( Bouras, 2005).

##### **5-1-1- Effet de la source de carbone**

Le choix de la source du carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique ou de mycotoxine. Les substrats rapidement métabolisés tels que le glucose peuvent souvent réaliser des taux de croissance cellulaire maximale, mais sont connus pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires. Cette "répression du catabolite" semble être due aux intermédiaires, produits du catabolisme rapide du glucose interférant avec les enzymes dans le processus du métabolisme secondaire. Gallo et Katz(1972), par exemple, ont observé que l'enzyme qui catalyse la formation du cycle du phénoxazinone d'actinomycine a été inhibée par le glucose (Awad, 2005).

##### **5-1-2- Effet de la source d'azote**

Les sources inorganiques d'azote comme les sels d'ammonium supportent une bonne croissance bactérienne mais entraînent une faible production en métabolites secondaires. Dans le cas de nombreux métabolites la production est meilleure lorsque la source d'azote est organique. Les sources plus favorables à la production de métabolites secondaires sont les acides aminés et les sources complexes d'azote qui supportent une croissance lente et une assimilation progressive de l'azote (Chorin, 2009). La figure 9 représente le métabolisme des différentes sources d'azote *via* ces différentes enzymes (Voelker et Ataca, 2001)



**Figure n° 9 :** Interconversion des molécules azotées dans le métabolisme central de l'azote chez *Streptomyces* (Voelker et Altaba, 2001).

### 5-1-3-Effet des Oligoéléments

La synthèse de métabolites secondaires a une tolérance plus faible à la gamme de concentration en oligoéléments que la croissance. Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Cu, Zn ...), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles. Certains jouent un rôle important, quantitativement et qualitativement, dans la biosynthèse des antibiotiques (Strub, 2008).

### 5-2- Facteurs physico-chimiques

L'influence des facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'amélioration des rendements n'est pas à négliger (Bouras, 2005).

*Etude expérimentale*

## *II. Matériel et Méthodes*

### II .Matériel et méthodes

L'ensemble de ce travail a été réalisé au niveau du laboratoire de microbiologie de la faculté de sciences exactes et sciences de la nature et de la vie, département de biologie moléculaire et cellulaire de l'université de Jijel.

#### 1- Matériel

##### 1-1- Echantillons du sol

La niche écologique utilisée pour l'isolement des actinomycètes est le sol forestier du parc de Taza à El-Aouana (Jijel).

##### 1-2- Microorganismes indicateurs

###### a) Les bactéries

10 bactéries tests ont été utilisées pour tester l'activité antibactérienne, dont 3 bactéries à Gram+: *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Staphylococcus aureus* résistante à la méthicilline (SARM) (Isolée en médecine humaine), et *Bacillus subtilis* (/), et 7 bactéries à Gram : *Salmonella sp*, *Escherichia coli 16* (Isolée en médecine humaine), *Klebsiella pneumoniae* (Isolée en médecine humaine), *Klebsiella oxytoca* (Isolée en médecine humaine), *Proteus mirabilis* (Isolée en médecine humaine), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922.

###### b) Les champignons et levures

Les activités antifongiques ont été déterminées contre 2 champignons filamenteux: *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus versicolor*, et contre une seule levure: *Candida albicans*.

##### 1-3- Antibiotiques:

Dans le but d'évaluer la résistance et la sensibilité des bactéries indicatrices aux antibiotiques, cinq disques d'antibiotiques ont été utilisés à savoir: Streptomycine (10µg), Pénicilline G (6-10µg), Céfotaxime (30µg), Spiramycine (100µg), et Compounds Sulphonamides (10µg).

##### 1-4- Antifongiques

Afin d'inhiber sélectivement les champignons lors de l'isolement des streptomycètes du sol, un seul antifongique a été utilisé la nystatine (DCI: Farlucand) à 50ppm (50mg/l).

##### 1-5- Milieux de cultures

Pour la réalisation de différentes parties expérimentales, on a utilisé les milieux suivants:

- Milieu de Kuster-Amidon: gélose et liquide, utilisé pour l'isolement des actinomycètes, et pour l'optimisation des conditions de production de substances bioactives, respectivement (Site1).
- Gélose Hectoen: pour la confirmation de la pureté des entérobactéries utilisées comme souches tests.
- Utilisée pour l'étude de l'activité antibactérienne.
- Gélose nutritive: Pour la culture de certaines souches tests et pour tester la résistance antibactérienne des souches.
- Gélose Sabouraud: Utilisée pour l'étude de l'activité antifongique.
- Bouillon nutritif: Pour l'enrichissement.
- Milieu Urée-indole: Pour l'étude de la production d'indole, d'indole pyruvique et de l'enzyme uréase.
- Bouillon nitrate: A servi à l'étude de la réduction du nitrate par l'enzyme nitrate réductase.
- Milieu TSI: Pour l'étude de la réduction du sulfate.
- Milieu Bennett: Liquide, utilisé pour l'optimisation.
- Milieu à la tyrosine: Pour tester la production de pigments (mélanine).

### 1-6- Produits chimiques et réactifs

Nous citons ce qui suit:

- Violet de gentiane, Fuch sine, Lugol, Alcool: Pour la coloration de Gram.
- HCl (1N), NaOH (1N et 3N): Pour l'ajustement du pH.
- Eau oxygénée: Pour le test à catalase.
- Réactif de Kovacs: Pour la mise en évidence de l'indole.
- Réactif à TDA (Tryptophane Désaminase): Pour la mise en évidence de l'indole pyruvique.
- Réactifs: Nitrate réductase I et II: Pour l'étude de la réduction des nitrates.
- Poudre de zinc: Pour la réduction des nitrates.
- Eau distillée et Eau physiologique (à 9 % de NaCl): Pour la préparation des milieux de culture principalement, et différentes suspensions respectivement.
- Solution de Mc Farland 0.5M: Pour l'activité antimicrobienne.
- Huile à immersion: Pour l'observation microscopique.
- Glycérol: Pour la conservation des souches.

### 1-7-Appareillage et autres

Au cours des manipulations, le matériel suivant a été utilisé:

- Autoclave (SHIAVX electronic).
- Four Pasteur (CONTROLS).
- Spectrophotomètre.
- Réfrigérateur.
- Centrifugeuse (Hettich).
- Compteur de colonies.
- Balance (DENVERIN STRUMENT).
- Agitateur magnétique (BUNSEN).
- Vortex électronique (MS2 Minishaker).
- Etuve de 28°C (Mammert), et étuve de 37°C.
- pH mètre (HANA instrument).
- Disques de papier Wattman.
- Bec Bunsen.
- Boîtes de Pétri, Tubes à essai, Flacons, pipettes graduées, micropipettes, anse de platine, pipettes automatique.
- Bain-marie sans et avec agitation.
- Lames et lamelles.
- Ecouvillons.
- Microscope optique.
- Microscope à caméra.
- Mortier.

### 2- Méthodes

#### 2-1- Isolement des actinomycètes à partir du sol:

##### 2-1-1- Prélèvement des échantillons

Les échantillons de sol ont été prélevés à partir d'un sol humide, très riche en matière organique d'un site forestier du Parc de Taza d'El-Aouana (Photographie 1). Les prélèvements ont été effectués à l'aide d'une spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol ont été écartés, on prélève ensuite dans la couche sous-jacente (entre 5 et 15 centimètres de profondeur) quelques grammes de terre déposés dans des flacons stériles (les gros débris sont écartés comme les pierres, racines, etc.)(Kitouni ., 2007). Deux échantillons ont été prélevés de deux sites différents dans l'enceinte du parc et transportés aussitôt au laboratoire.



**Photographie n°1 :** Site de prélèvement (Parc de Taza).



**Photographie 2 :** Prélèvement des échantillons

### 2-1-2- Mesure du pH du sol

Une quantité de 20 g de terre est pesée, mélangée à 50 ml d'eau distillé et agitée pendant 1 mn, après 2 h de repos, le pH est mesuré par un pH mètre.

### 2-1-3- prétraitement des échantillons

Avant l'étape d'isolement les échantillons ont subi 2 prétraitements successifs:

- **Prétraitement 1:** Quelques grammes de sol (de chaque site) sont séchés à l'étuve à 37°C pendant 10 jours. Cette étape conduit à une augmentation des colonies de actinomycètes dont les spores ont une résistance de plus de 10 ans en terre desséchée, en même temps cela élimine la plupart des bactéries (site 1, El-Nakeeb et Chevalier, 1963).
- **Prétraitement 2:** Consiste à chauffer quelques grammes de chaque échantillon à 50°C pendant 60 minutes pour l'aide à l'isolement sélectif des actinomycètes (élimination des formes végétatives) (Djaballah, 2010). Les échantillons sont placés dans des tubes à essai et incubé à 50°C au bain-marie. Ce chauffage réduit le nombre de bactéries sans affecter celui des Streptomycètes (site 1).

### 2-1-4- Méthodes d'isolement

L'isolement des souches a été réalisé par méthodes des suspensions-dilutions: la solution mère a été préparée après avoir suspendu 1g de terre, préalablement broyé dans un mortier, dans 10ml d'eau physiologique stérile, agité au Vortex et laissé décanté, cette suspension constitue la dilution  $10^{-1}$ , à partir de laquelle des dilutions jusqu'à  $10^{-6}$  ont été effectués.

100 microlitres des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  sont étalés sur milieu de: Kuster Amidon en gélose additionné de 50µg/ml de nystatine pour inhiber le développement des champignons filamenteux. Les boîtes de Pétri sont alors incubées à 28°C pour au moins une semaine.

Elles sont purifiées sur le milieu Kuster amidon, par la suite, conservées d'une part à -4°C en gélose inclinée, d'autre part à -20°C en suspension en présence de et glycérol à 20 % (v/v) selon (Djaballah, 2010).

## 2-2- Caractérisation des souches

### 2-2-1- Observation microscopique

Afin de mettre en évidence l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes. L'ensemble des colonies isolées sont observées sous microscope Grossissement x10.

### 2-2-2- Coloration de Gram

Afin de mettre en évidence la coloration à Gram positive des souches isolées, l'aspect filamenteux caractéristique des actinomycètes, et la présence des spores. L'ensemble des colonies isolées sont observées après coloration de Gram sous microscope optique.

Elle est effectuée selon la méthode classique. Des frottis de colonies répondant aux caractéristiques macroscopiques et microscopiques des actinomycètes sont préparées, colorés puis observés sous microscope optique (grossissement ×100) (Zermane, 2008).

### 2-2-3- Test à catalase

La catalase est une enzyme catalysant la dismutation de l'eau oxygénée (peroxyde d'hydrogène), selon la réaction suivante :  $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{O}_2 + 2\text{H}_2\text{O}$ .

Elle est mise en évidence par contact de la culture avec une solution fraîche d'eau oxygénée. Pour chaque souche une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame stérile sur laquelle quelques colonies sont réparties. Un dégagement gazeux abondant sous forme de Mousse ou de bulles d'air traduit la décomposition de l'eau oxygénée sous l'action de la catalase (Zermane, 2008).

#### 2-2-4- Réduction des Nitrates

Des bouillons nitrates sont ensemencés et incubés à 28°C, 3 gouttes de chacun des réactifs de nitrate réductase I et II sont ajoutées à la culture de 24h ou 48h d'incubation (selon la croissance). La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge. En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés, s'il y'a:

-L'apparition de la coloration rouge: les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souches (résultat négatif). Absence de coloration: les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites (résultat positif)(Aouar., 2006).

#### 2-2-5- Production d'indole

Certaines bactéries désaminent et hydrolysent le tryptophane jusqu'au stade indole grâce à la tryptophanase, ce dernier en présence d'acide nitrique-nitreux donne du nitroso-indole rouge en milieu acide. A partir d'une culture de 24h ou 48h en milieu urée indole, on ajoute quelques gouttes de réactif d'Erlich-Kovacs avec agitation. L'apparition de l'anneau rouge vermillon indique un test positif (indole +), l'anneau jaune ou brunâtre est un test négatif (indole -).

#### 2-2-5- Recherche de la tryptophane désaminase (TDA)

La désaminase agit sur le L-tryptophane en donnant de l'acide indole pyruvique, qui produit avec le perchlorure de fer une coloration brune.

On ensemence largement un tube du milieu Urée indole à partir d'une culture de *Streptomyces* sur milieu solide, on incube les tubes à 28°C pendant 48h maximum, après on ajoute 2 gouttes de perchlorure de fer (réactif à TDA). L'apparition de la coloration brune rouge est un test positif (TDA+).

#### 2-2-6- Recherche de l'Uréase

Les milieux Urée-indole sont ensemencés par les souches à tester, la lecture est effectuée après incubation à 28°C pendant 24h à 48h. Si la couleur du milieu vire vers le rouge ou le rose la bactérie est Uréase positive, si le milieu reste jaune le test est négatif.

#### 2-2-7- Réduction des sulfates

Le milieu TSI (à 3 Sucres) a été utilisé pour étudier la production de l'H<sub>2</sub>S. Le milieu TSI est ensemencé par piqure au culot, et sur la pente par des stries serrées et parallèles, et incubé à 28°C. Ce milieu donne une réponse en 24h ou 48h: la production d'H<sub>2</sub>S se traduit par le noircissement du milieu.

#### 2-2-8- La production de mélanine

Elle est déterminée qualitativement après 4jours d'incubation sur un milieu gélosé à la tyrosine, le milieu est coulé en pente, la formation de mélanine est mise en évidence par la coloration gris-noir à bleu-noir du milieu après 1 à 2 jours. Le résultat est clairement positif ou négatif (site 1).

### 3- Antibiogramme

La méthode de la diffusion d'antibiotique en gélose ou méthode des disques est la plus fréquemment utilisée, son principe consiste à déposer des disques de papier buvard imprégnés d'une charge donnée d'antibiotique à la surface d'un milieu gélosé Mueller-Hinton préalablement ensemencé avec une suspension d'environ 10<sup>6</sup> bactéries/ml.

L'antibiotique diffuse dans la gélose, les concentrations diminuant au fur et à mesure que l'on s'éloigne du disque. Une zone d'inhibition de la culture microbienne est observable autour du disque d'antibiotique après 18 heures d'incubation à 37°C (Delery, 1999).

Pour la détermination de la sensibilité ou de la résistance des 10 souches tests utilisées et afin de tester l'effet des streptomycètes isolés sur ces souches, cinq antibiotiques différents (Streptomycine, Pénicilline G, Céfotaxime, Spiramycine, compound Sulphonamides) ont été utilisés. L'antibiogramme se fait selon trois étapes:

- a) Préparation de l'inoculum bactérien.
- b) Ensemencement par écouvillonnage, après comparaison avec la solution de 0,5 Mc Farland.
- c) Application des disques d'antibiotiques.
- d) Incubation à 37°C pendant 24 h.

#### **4- Recherche de l'activité antimicrobienne des actinomycètes isolés**

##### **4-1- L'activité antibactérienne**

###### **4-1-1- Inocula des bactéries-tests**

L'activité antibactérienne des souches isolées est recherchée contre des bactéries-tests constituées de bactéries à coloration de Gram positive: *Staphylococcus aureus* ATCC 29523, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* (SARM), et des bactéries à Gram négative: *Salmonella sp*, *Escherichia coli* 16, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli* ATCC 25922, et *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853.

Une culture de 24 h sur bouillon nutritif est préparée, la densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile, avant d'être ensemencée sur milieu Mueller-Hinton par écouvillonnage ou par inondation. La méthode par inondation consiste à verser la dilution de l'eau physiologique sur toute la surface du Mueller-Hinton puis à éliminer le surplus par pipette graduée (Kitouni ., 2007).

###### **4-1-2- Technique des cylindres d'agar**

Les souches des *Streptomyces* isolées sont ensemencées en stries serrées sur le Milieu Kuster Amidon et incubées à 28°C pendant au moins 7 jours.

Des cylindres d'agar sont préparés à l'aide de pipettes Pasteur, ensuite prélevés et déposés à la surface du milieu de Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries-tests. Les boîtes sont alors placées à 4°C pendant 4 heures pour permettre la diffusion des substances antimicrobiennes, puis incubées à 37°C pendant 24 heures, les diamètres sont alors mesurés après incubation (Bastide, 1986).

###### **4-2- Recherche de l'activité antifongique et antilevurienne**

L'activité antifongique des *Streptomyces* isolées est mise en évidence par la technique des cylindres d'agar contre les champignons filamenteux: *Rhizomucor miehei*, *Aspergillus versicolor*, et la levure *Candida albicans*, pour lesquelles l'activité est réalisée sur la gélose de Sabouraud. Des cylindres d'agar sont déposés sur la gélose, et les boîtes sont placées pendant 4 heures à 4°C avant d'être incubées. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée après 24 heures d'incubation à 28°C pour la levure et après 48 heures pour les champignons filamenteux.

### 4-3- Optimisation:

#### 4-3-1- Choix du milieu optimal de production des substances antibactériennes:

Dans le but d'optimiser la croissance des souches et la production de métabolites à activité antibactérienne, nous avons testé trois souches (A19, A16, A13) ayant montré la plus importante activité antibactérienne, pour cela les souches ont été cultivées sur deux milieux liquides différents (Bennett et Kuster amidon) voir annexe. L'incubation dure 7 jours. L'activité antibactérienne est testée par la technique des disques de papier Wattman stériles.

##### 4-3-1-1- Culture des Streptomycètes à activité antibactérienne en milieu liquide:

Tout au long de ces expériences, la même quantité de l'inoculum initial a été ajustée. Des cultures initiales des Streptomycètes sont cultivées à 28°C pour 24 heures à 48 heures. La densité optique des cultures est ensuite mesurée à 600nm et considérée comme la DO initiale.

Les souches des Streptomycètes préalablement cultivées sont ensemencées dans des flacons contenant 100ml de chaque milieu: Bennett et Kuster amidon. Les flacons sont ensuite placés dans un bain-marie thermostaté à 28°C et animés d'un mouvement de va et vient (140 tours par minute).

##### 4-3-1-2- Mesure de la DO et du pH

A partir du temps zéro, des prélèvements de culture sont réalisés chaque jour pendant une semaine. La croissance des Streptomycètes est suivie à 600nm, et le pH est mesuré pendant les mêmes intervalles de temps.

##### 4-3-1-3- Technique des disques

Après quatre jours le test d'activité antimicrobienne est réalisé par la technique des disques stériles non imprégnés (Papier Wattmen), les disques sont prélevés et déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton préalablement ensemencé par les bactéries-tests: *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *E. coli* 16, et *Staphylococcus aureus* (SARM), les disques sont imbibés de 5 à 10µl du surnageant de chaque Streptomycètes, surnageants obtenus après 4 jours de culture par centrifugation à 60 000 tours par minute pendant 15 minutes. Avant incubation à la température 37°C, les boîtes sont laissées deux heures à 4°C, pour permettre une pré-diffusion des substances bioactives.

##### 4-3-1-4- Technique des puits

A l'aide d'une pipette Pasteur, des puits sont creusés dans le milieu Muller Hinton préalablement ensemencé par écouvillons avec les microorganismes tests. Une quantité de 20 µl des surnageants des cultures liquides des Actinomycètes est déposée dans chaque puits. Les boîtes sont laissées à température ambiante pendant 2 heures, puis incubées à 37°C pendant 24 heures. Les diamètres d'inhibitions sont mesurés et notés.

#### 4-3-2- pH du milieu de culture

Afin de déterminer l'effet du pH sur la production des molécules antibactériennes, 2 souches (A16, A19) à activité antibactérienne, antifongique et antilevurienne ont été cultivées sur milieu de culture Bennett préparé à différents pH (5,5, 7 et 7,5) à raison de 3 flacons par souche pour chaque pH.

L'ajustement de l'inoculum, les mesures de la DO et du pH, et le test de l'activité antibactérienne ont été effectuées selon les mêmes méthodes précédemment décrites.

### *III. Résultats et Discussion*

# Résultats et discussion

---

## 1. Résultats :

### 1-1- Le pH du sol

La valeur du pH de nos échantillons est de **7.11**. On peut dire donc que notre sol est pratiquement neutre.

### 1-2- Isolement des actinomycètes:

Au bout de 4 à 7 jours d'incubation à 28°C des colonies colorées et typiques des actinomycètes sont apparues **Photographie n° 3**, les colonies dont l'aspect microscopique et macroscopique est caractéristique des actinomycètes sont isolées à partir des dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$ , 22 colonies sont isolées et purifiées sur le milieu Kuster Amidon contenant un antifongique; la nystatine.



**Photographie n° 3 :** Apparition de colonies après isolement sur milieu Kuster-amidon.

#### 1-2-1- Observation microscopique des isolats

L'observation des isolats au microscope optique au grossissement ( $\times 10$ ) nous permet de distinguer les filaments qui émanent des colonies et donc de confirmer l'aspect filamenteux de celles-ci, ce qui permet de les distinguer des autres types de microorganismes tels les bactéries. Les champignons ont été éliminés par l'antifongique utilisé.

## Résultats et discussion

### 1-2-2- L'observation macroscopique des isolats:

Le tableau ci-dessous résume l'aspect macroscopique des différentes colonies isolées

**Tableau n° 5 :** Aspect macroscopique des colonies des souches d'actinomycètes isolées

Les souches isolées	Les colonies de base		
	La forme	La taille	La couleur
A1		Grande	Bords Blanc et centre bleu bombé
A2	ronde avec contour régulier	Moyenne	Bords Rouge et centre jaune
A3	ronde avec contour régulier	Moyenne	Jaune
A4	ronde, bombée avec contour régulier	Moyenne	Blanche
A5	ronde avec contour régulier	Grande	Bords Violet et centre blanc
A6	ronde, bombée avec contour régulier	Petite	Orange
A7	ronde avec contour irrégulier	Grande	Bords Blanc et centre bleu clair
A8	ronde avec contour irrégulier	Grande	Bords Beige et centre blanc
A9	ronde, bombée avec contour régulier	Petite	Bords Blanc et centre noire
A10	ronde avec contour irrégulier	Moyenne	Bords bleu et centre Blanc

## Résultats et discussion

A11	ronde, bombée	Moyenne	Grise
A12	Ronde	Grande	Bords Marron et centre Beige
A13	Ronde	Petite	Bords Beige et centre blanchâtre
A14	ronde avec contour régulier, poudreuse	Petite	blanchâtre
A15	ronde avec contour régulier, lisse	Petite	Jaune
A16	ronde	Moyenne	Marron foncé
A17	ronde avec contour régulier poudreuse	Petite	Grise
A18	ronde avec contour régulier poudreuse	Petite	Grise foncé avec centre et bords noire
A19	ronde avec contour irrégulier	Grande	Blanche avec des bords noirs
A20	ronde avec contour régulier, bombée	Petite	Blanche et grise
A21	Ronde, bords plats et centre élevé	moyenne	verte
A22	Ronde, bombée	petite	jaune

Toutes les colonies ont une forme ronde de contours réguliers ou irréguliers avec différentes couleurs : Blanche, Rouge, Jaune, Grise, Beige, Violette... etc.

Selon la taille on peut les diviser en colonies: Grandes; représentées par les souches A1, A2, A5, A7, A8, A12, A19, moyennes; représentées par les souches A3, A4, A10, A11, A16

## Résultats et discussion

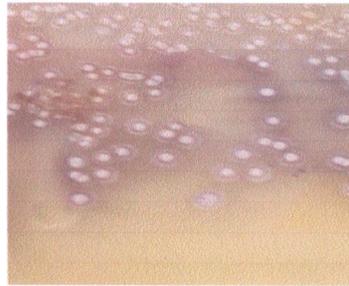
---

et petites; représentées par les souches A6, A9, A13, A14, A15, A17, A18, A20.

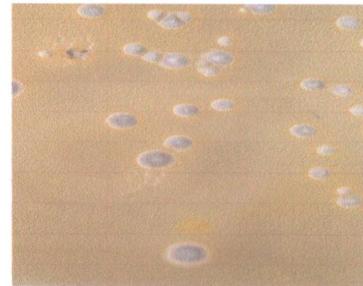
Ces colonies représentent le mycélium du substrat qui s'est formé dans les premiers stades de la croissance et s'est développé sur la gélose puis s'est enfoncé radicalement dans la gélose. Quelques unes des souches isolées des plus remarquables sont présentées dans la (Photographie n° 4)



(A)



(B)



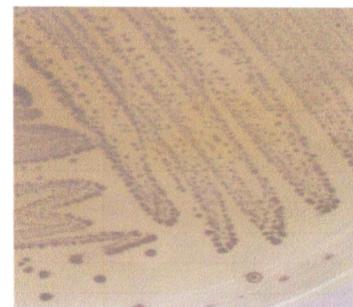
(C)



(D)



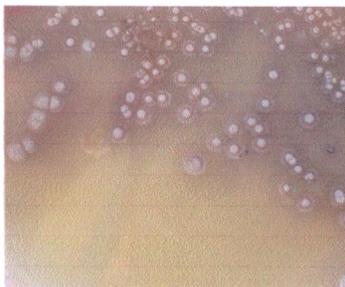
(E)



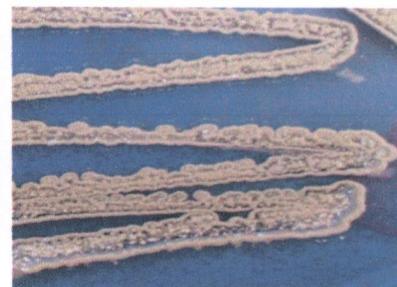
(F)



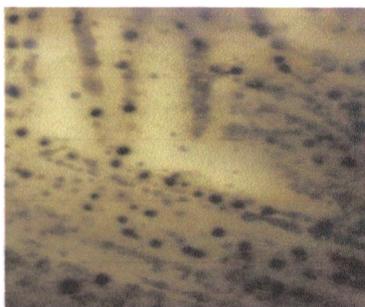
(G)



(H)



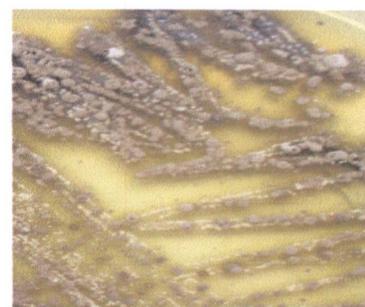
(I)



(J)



(K)



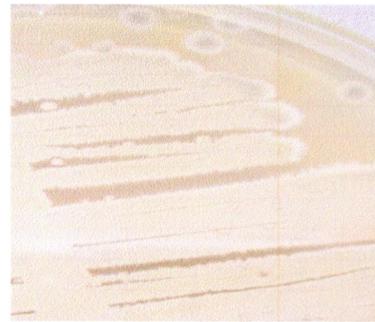
(L)

## Résultats et discussion

---



(M)



(N)

**Photographie n° 4 :** Représentations photographiques des principaux actinomycètes isolés. (A): souche A2, (B): souche A5, (C): souche A1, (D): souche A 19, (E): souche A13, (F): souche A11, (G), (H): souche A5 sur kuster-amidon, (I): souche A5 sur Bennett, (J): souche A5 sur Bennett, photo sur boîte de Pétri retournée, (K): souche A21, (L): souche A21, photo sur boîte retournée, (M): souche A22, (N): souche A14.

L'aspect des colonies est caractéristique, elles sont rondes, souvent poudreuses et légèrement ou complètement enfoncées dans la gélose. Elles sont le plus souvent colorées (Photographie n° 4); ces colorations sont très variées et s'expliquent par la présence de pigments de natures très différentes. La pigmentation est le plus souvent différente entre le mycélium substrat et les spores. De ce fait, la coloration est rarement homogène au niveau de la colonie. De plus, des pigments diffusibles peuvent être présents (: B, E, G, J, L), dont la couleur est sensible au pH ou non. Ils peuvent être solubles dans le milieu (Photographie I) ou précipiter au voisinage de la colonie (Photographie G).

### 1-2-3- Coloration:

Après une coloration de Gram, l'observation des frottis au microscope optique à l'objectif à immersion ( $G \times 100$ ) montre que toutes les souches isolées sont à coloration de Gram positive avec des corps bactériens filamenteux colorés en violet.

Tous les isolats montrent un aspect filamenteux avec un mycélium libre dès les premiers jours d'incubation

(Photographie A) un mycélium beaucoup plus ramifié est observé au delà de 5 jours d'incubation à 28°C (photographie A), avec une aptitude à former des spores, qui visibles sous forme de chaînettes droites dans le cas de la souche A5 (Photographie n° 6)

## Résultats et discussion

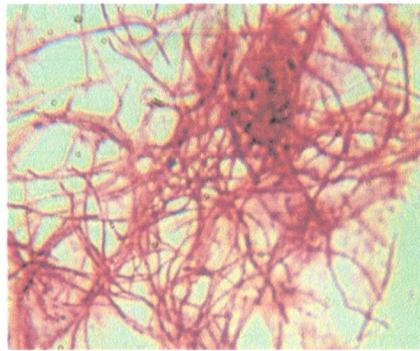
---



(A)



(B)



(C)

**Photographie n° 5:** Aspect filamenteux de la souche A5 après coloration de Gram et observation microscopique au grossissement  $G \times 100$ . (A) forme libre: filament de petite taille. (B) forme plus ramifiée. (C) Enchevêtrement après une ramification plus dense



**Photographie n° 6 :** Formation de spores : observation microscopique au grossissement  $G \times 100$  après coloration de Gram.

## Résultats et discussion

### 1-3- Les tests biochimiques

**Tableau n° 6 : Résultats des tests biochimiques**

Les Souches isolés	Catalase	Production de l'indole	Réduction de nitrate	Réduction de sulfate	Production d'indole pyruvique	Urease	mélanine
A1	+	-	+	-	+	+	-
A2	+++	-	+	-	-	-	-
A3	+	-	+	-	+	+	-
A4	+++	-	+	-	+	+	-
A5	++	+	+	-	+	+++	-
A6	+	+	+	-	-	+	-
A7	+	+	+	-	+	+	-
A8	+	+	+	-	+	+	-
A9	+	+	+	-	+	+	-
A10	+	-	+	-	-	+++	-
A11	+++	+	+	-	+	+	-
A12	+	+	+	-	-	+	-
A13	+	-	+	-	-	+	-
A14	+	-	+	-	+	+	-
A15	+	+	+	-	-	+	-
A16	+	+	+	-	+	-	-
A17	+	-	+	-	-	+	-
A18	+	-	+	-	+	+	-
A19	+	-	+	-	+	-	-
A20	+	-	+	-	+	-	-
A21	+	+	+	-	-	+	-
A22	+	-	+	-	+	+	-

+++ : forte réaction, + : faible réaction

- : pas de réaction

## Résultats et discussion

Le tableau ci-dessus montre l'ensemble des tests effectués

Ces tests ont été menés en complément avec la coloration de Gram pour confirmer l'appartenance des souches isolées aux actinomycètes. Toutes les souches sont catalase positive, H<sub>2</sub>S négative, nitrate réductase positive, elles sont majoritairement urease, indole pyruvique et indole positive. Cependant, la production de pigments bleus à noirs due à la libération de mélanine, sur le milieu utilisé (milieu à la tyrosine) n'a pas été observée en parallèle avec la croissance.

### 1-4- l'antibiogramme

**Tableau n° 7 : Résultats d'antibiogramme (Les zones d'inhibition en mm)**

Les antibiotiques	<i>E. coli</i> ATCC 25928	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli</i> 16	<i>S. aureus</i> ATCC 29523	<i>B. subtilis</i>	SARM
Streptomycine	18	12	18	17	11	16	10	20	26	19
Spiramycine	11	0	9	9	0	11	11	10	26	0
Sulfonamide	24	25	29	29	0	0	0	30	25	23
Pénicilline G	0	0	0	0	0	0	0	0	27	10
Céfotaxime	2	0	0	25	26	0	20	22	11	0

Ces résultats montrent que la majorité des souches ont une multi-résistance vis-à-vis des antibiotiques testés en comparaison avec la table des références (annexe). Les résultats photographiques correspondants à l'antibiogramme sont présentés dans l'annexe.

D'après ces résultats et les résultats des activités antibactériennes des Actinomycètes, on peut constater que la majorité des actinomycètes peuvent inhiber la majorité des souches tests multi-résistantes d'où l'intérêt de notre recherche

### 1-5- Test de l'activité antimicrobienne des isolats:

Les 22 souches sont testées pour leur activité antibactérienne et antifongique et antilevurienne.

## Résultats et discussion

### 1-5-1 Test de l'activité antibactérienne des isolats:

Le tableau ci-dessous résume les résultats d'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes vis-à-vis de 10 souches tests qui sont: des bactéries à coloration de Gram négative : *E. coli* ATCC 25928, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *K. pneumoniae* (Isolée en médecine humaine), *K. oxytoca* (Isolée en médecine humaine), *P. mirabilis* (Isolée en médecine humaine), *Salmonella sp* (Isolée en médecine humaine), *E. coli 16* (Isolée en médecine humaine), et des bactéries à coloration de Gram positive: *S. aureus* ATCC 29523, *B. subtilis* (-), *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) (Isolée en médecine humaine).

**Tableau n°8** : Résultats d'activité antibactérienne des actinomycètes isolés.

Les zones d'inhibition en mm vis-à-vis les souches tests

Les souches isolées	<i>E. coli</i> ATCC 25928	<i>P. aeruginosa</i> ATCC27853	<i>K. pneumoniae</i>	<i>K. oxytoca</i>	<i>P. mirabilis</i>	<i>Salmonella</i>	<i>E. coli 16</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 29523	<i>B. subtilis</i>	SARM
A1	–	10	8	–	10	7	7	9	10	9
A2	7	7	6	6	6	9	–	–	8	7
A3	7	12	6	–	–	8	5	–	10	10
A4	9	7	6	7	6	8	–	–	–	–
A5	7	11	8	6	9	7	–	10	6	7
A6	8	–	6	–	–	9	–	7	7	–
A7	10	11	8	–	–	7	–	7	12	8
A8	8	7	7	–	–	8	10	–	12	–
A9	8	12	11	–	10	20	7	–	8	8
A10	8	–	10	9	9	7	–	9	10	10
A11	10	10	8	–	–	8	8	9	10	9
A12	–	10	8	10	–	7	10	6	6	7
A13	6	14	15	13	10	9	10	13	22	8
A14	7	8	7	–	–	9	–	–	10	–

## Résultats et discussion

A15	9	11	13	–	9	12	7	10	9	–
A16	8	11	14	11	–	10	10	10	–	6
A17	–	13	10	13	–	–	10	–	9	15
A18	8	–	10	10	8	8	–	7	8	7
A19	7	9	10	11	–	8	–	13	22	17
A20	9	9	–	8	9	8	10	8	7	8
A21	8	9	9	–	–	–	8	9	–	6
A22	–	–	8	–	8	8	–	7	6	6

– : pas d'activité

Les résultats obtenus montrent que toutes les souches d'actinomycètes isolées possèdent au moins une activité antibactérienne contre une des souches tests, tous les isolats ont des activités antibactériennes sur les bactéries à coloration de Gram positive et sur les bactéries à coloration de Gram négative. A l'exception de la souche A4 qui n'a pas d'activité contre toutes les bactéries à coloration de Gram positive. Les zones d'inhibitions varient d'une souche test à une autre, et d'une souche d'actinomycètes à une autre. Les deux souches d'actinomycètes A13 et A19 ont les deux zones d'inhibition les plus grandes (22 mm) (contre *B. subtilis*). La souche A13 a une activité antibactérienne contre toutes les souches tests.

### 1-5-2- Test de l'activité antifongique et antilevurienne des isolats

. Le tableau ci-dessous résume l'activité antifongique des souches d'actinomycètes vis-à-vis deux champignon ; *Rhizomocor miechei* et *Aspergillus versicolor*, et une levure *Candida albicans*

Sur les 22 souches des Actinomycètes sélectionnées seules 3 souches (A16, A18, A19) ont une activité antifongique soit 13,63 % des isolats.

Et 10 souches (A1, A2, A9, A10, A12, A15, A16, A17, A19, A22) ont une activité antilevurienne soit 45 % des isolats.

Les deux souches A16 et A19 ont une activité vis-à-vis des 3 souches tests.

## Résultats et discussion

---

**Tableau n° 9 :** L'activité antifongique et antilevurienne des souches isolées (Les zones d'inhibition en mm)

Les souches isolées	<i>Rhizomucor miehei</i>	<i>Aspergillus versicolor</i>	<i>Candida albicans</i>
A1	–	–	7
A2	–	–	6
A3	–	–	–
A4	–	–	–
A5	–	–	–
A6	–	–	–
A7	–	–	–
A8	–	–	–
A9	–	–	6
A10	–	–	7
A11	–	–	–
A12	–	–	6
A13	–	–	–
A14	–	–	–
A15	–	–	6
A16	6	11	8
A17	–	–	7
A18	–	9	–
A19	11	10	14
A20	–	–	–
A21	–	–	10
A22	–	–	–

– : pas d'activité

## Résultats et discussion

---

De manière générale l'activité antibactérienne de ces 22 souches isolées est plus importante que leurs activités antifongiques et antilevuriennes.

Parmi les 22 souches sélectionnées les 03 souches des Actinomycètes A13, A16, A19 présentent des activités antibactériennes, antifongiques et antilevuriennes vis-à-vis de plusieurs souches testes et avec des spectres d'inhibitions des plus grands.

Pour cette raison on va les considérés comme des souches représentatives de l'ensemble des isolats afin d'optimiser le milieu de culture et le pH pour une bonne production de substances antibactérienne.

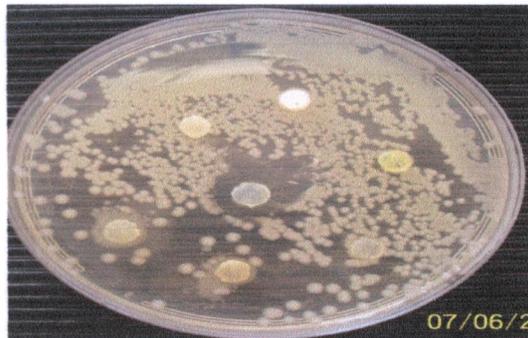
La photographie n° 10 montre certains résultats des activités antimicrobiennes des souches tests.



1



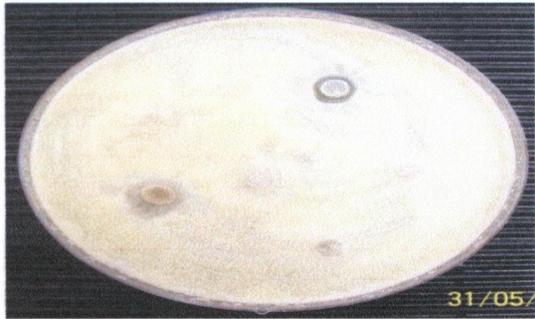
2



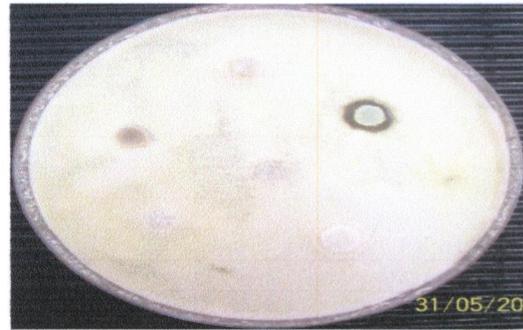
3

**Photographie n° 7:** Activités antibactériennes des souches isolées. **1.** Activité de la souche A13 contre *B. subtilis* au centre à gauche. **2.** Activités contre *P. mirabilis* de la A5 en haut à droite (pigmentation marron), et de la A10 en bas à gauche (pigmentation jaune) avec la diffusion d'une pigmentation verte au centre à gauche et une faible activité. **3.** Activité de l'A16 contre *K. pneumoniae* au centre

## Résultats et discussion



1

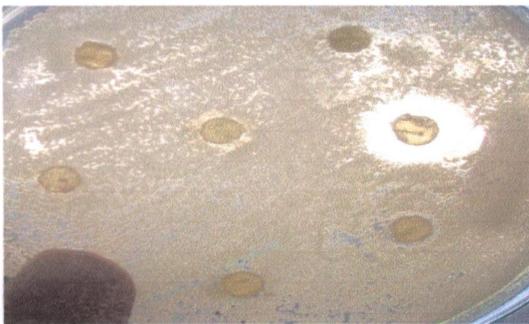


2



3

**Photographie n° 8 :** Activités antifongiques des souches isolées. **1.** Activité de la souche A19 contre *A. versicolor* en haut à droite et de l'A16 au centre à gauche, **2.** Activité de la souche A19 en haut à droite et A 16 en haut à gauche contre *A. versicolor*. **3.** Activité de l'A19 contre *R. miehei*,



1



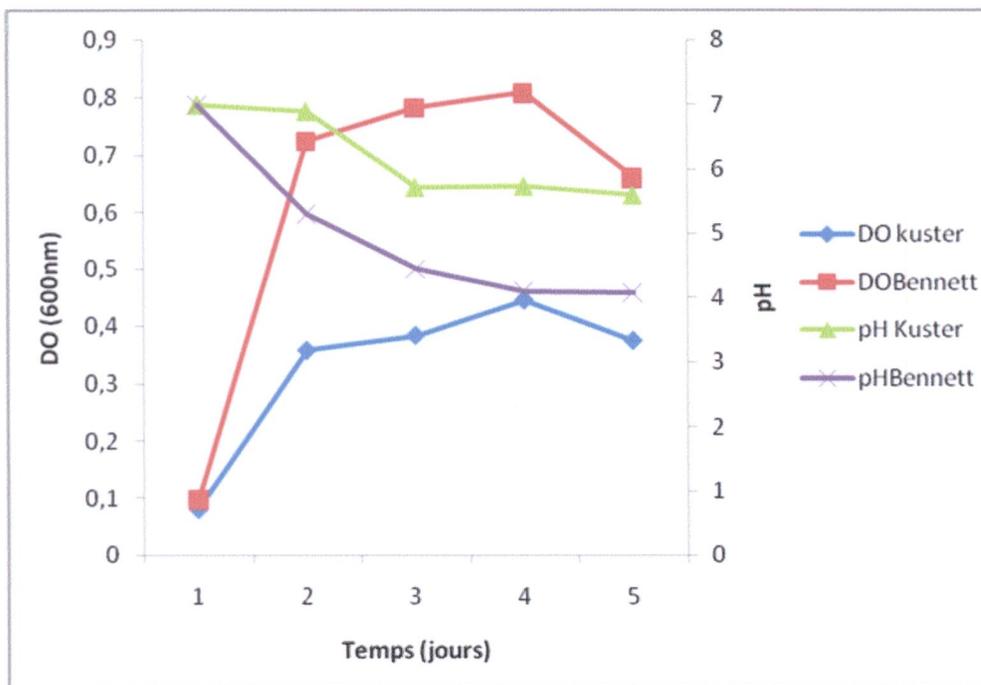
2

**Photographie n° 9 :** Activités antilevuriennes des souches isolées. Activité de la A19 contre *candida albicans* sur fond blanc **1**, et sur fond noir **2**.

### 1-6- Etude de l'influence du milieu de culture sur l'activité antibactérienne

#### 1-6-1- Cinétique de croissance des 3 souches isolées sur les deux milieux liquides kuster-amidon et Bennett

Les graphes ci-dessous résument les résultats obtenus des mesures de la DO et du pH à différents intervalles de temps:



**Figure n° 10 :** Relation entre la croissance de la souche A13 et le pH du milieu.

## Résultats et discussion

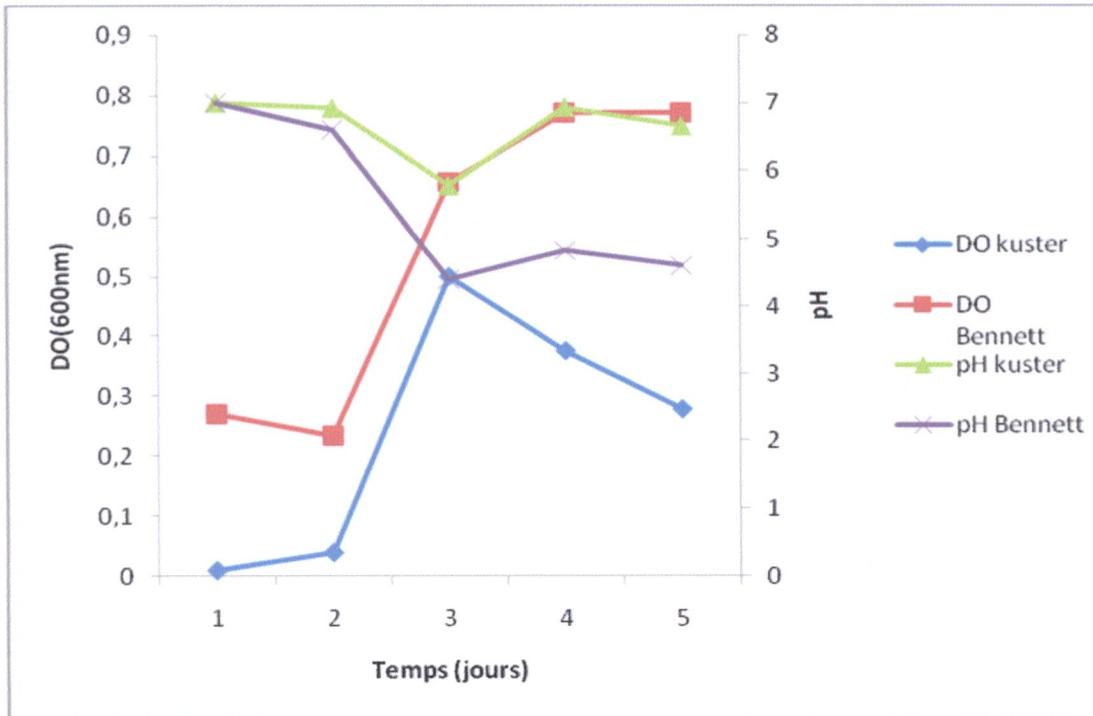


Figure n° 11 : Relation entre la croissance de la souche A16 et le pH du milieu

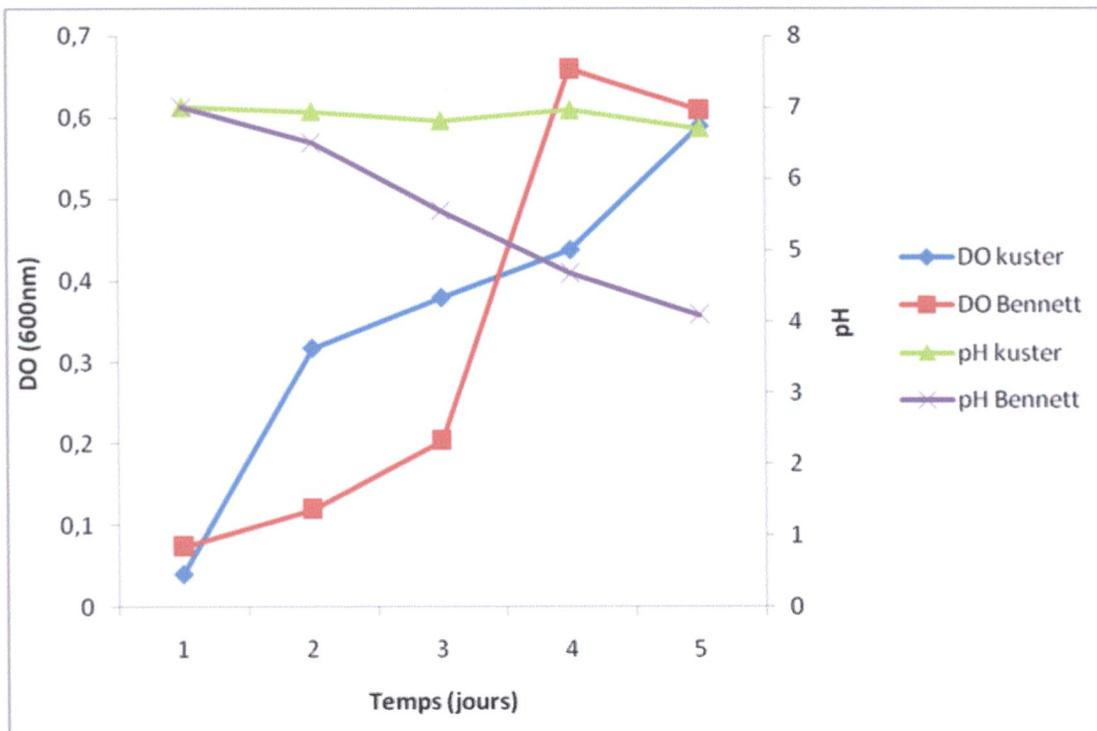


Figure n° 12 : Relation entre la croissance de la souche A 19 et le pH du milieu.

## Résultats et discussion

D'après les courbes on observe une augmentation progressive de la croissance entre le premier et le deuxième jour pour la A13 dans les deux milieux, dès le deuxième jour, pour la A16, et allant jusqu'à 4 jours pour la A19 en milieu Bennett et 5 jours pour la même bactérie en milieu Kuster, la croissance est accompagnée d'une nette diminution du pH dans le milieu Bennett dès le 1er jour, par contre la diminution du pH dans le milieu Kuster est assez lente pour la A13, légèrement inchangée pour la A16, diminue puis augmente pour la A16.

La phase de latence est pratiquement inexistante pour les 3 isolats, exceptés pour la souche A16 sur les deux milieux. Les cinétiques de croissance les plus élevées, sont marquées par une acidification du milieu de culture.

La croissance maximale des 03 bactéries isolées est obtenue sur le milieu Bennett. Le tableau ci-dessous montre la DO maximale des deux milieux Kuster et bennett ensemencés par les 3 souches isolées.

**Tableau n° 10** : Les valeurs des DO maximales des deux milieux Kuster et Bennett ensemencés par les 3 souches isolées.

Les souches isolées	la densité optique maximale	
	Bennett	kuster
A13	0.95	0.44
A16	0.85	0.50
A19	0.66	0.59

Aussi l'abaissement maximal du pH des milieux ensemencé par les 3 souches isolées est obtenu sur le milieu Bennett.

**Tableau n° 11** : Diminutions maximales de pH des deux milieux Bennett et Kuster ensemencés par les 3 souches isolées.

Les souches isolées	les valeurs du pH les plus basses	
	Bennett	kuster
A13	4.07	5.6
A16	4.40	5.78
A19	4.10	6.71

## Résultats et discussion

### 1-6-2- Activité antibactérienne des souches isolées sur les deux milieux liquides kuster et Bennett

L'activité antibactérienne des souches isolées a été testée au quatrième jour d'incubation par la technique des discs contre quatre bactéries tests. Le tableau ci-dessous résume les résultats obtenus.

**Tableau n° 12:** Résultats de l'activité antibactérienne des souches isolées sur les deux milieux liquides kuster et bennett

Les souches isolées	<i>E. coli</i> 16	<i>P. aeruginosa</i>	<i>SARM</i>	<i>B. subtilus</i>
A13 Kuster	11	11	9	10
A13 Bennett	11	9	10	11
A19 Kuster	11	12	8	10
A19 Bennett	13	8	7	11
A16 Kuster	8	7	8	7
A16 Bennett	9	8	9	8

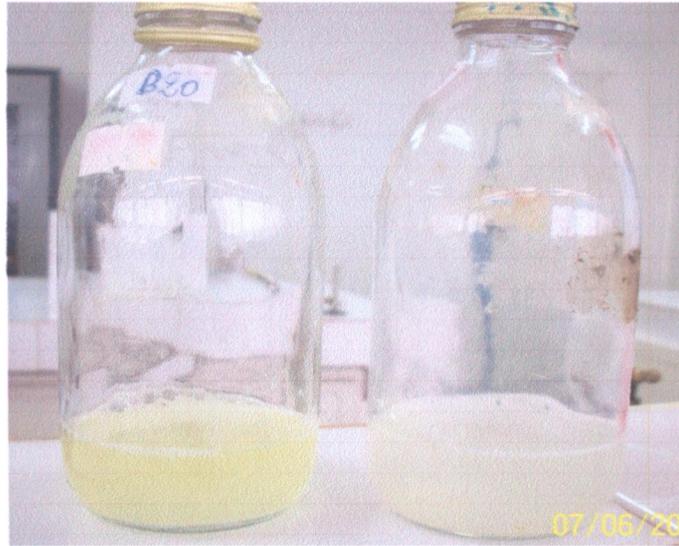
En général l'activité antibactérienne des 3 souches d'actinomycètes ensemencées sur le milieu Bennett est supérieure à celle des mêmes souches ensemencées sur le milieu kuster, à l'exception de l'activité de la souche A19 vis-à-vis de *P. aeruginosa* et *SARM* et de la souche A13 vis-à-vis de *P. aeruginosa* dont l'activité antibactérienne sur le milieu kuster est supérieure à celle du milieu Bennett.

Les différences entre les zones d'inhibition des souches d'actinomycètes ensemencées sur le milieu Bennett et celles des mêmes souches ensemencées sur le milieu Kuster est de l'ordre de 1 à 2mm.

Lors de cette expérience on a remarqué la production du pigment vert libéré dans le milieu de culture Bennett liquide à partir du 3<sup>ème</sup> jour (photographie n° 11).

A noter que la souche A16 libère un pigment de couleur verte qui n'a jamais été observé en culture pure sur milieu solide, mais visible uniquement lors des tests des activités antimicrobiennes sur cylindres d'agar, et en culture liquide lors de l'optimisation.

## Résultats et discussion



**Photographie n° 10 :** Coloration verte dans le flacon à gauche par rapport au témoin du milieu Bennett.

### 1-6-2- Etude de l'influence du pH du milieu de culture sur l'activité antibactérienne

Le tableau ci-dessous résume les résultats de l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes A19 et A16 vis-à-vis de 3 souches tests *E. coli* 16, *P. aeruginosa* et SARM sur milieu Bennett liquide après 4 jours d'incubation, à différentes valeurs du pH; pH 5.5, 7 et 7.5.

**Tableau n° 13:** Résultats de l'activité antibactérienne des souches isolées sur milieu Bennett à différent pH; 5.5, 7 et 7.5

Les souches isolées	<i>E. coli</i> 16			<i>P. aeruginosa</i>			SARM		
	PH 7	PH 7.5	PH 5.5	PH 7	PH 7.5	PH 5.5	PH 7	PH 7.5	PH 5.5
A19	8	8	9	7	8	8	9	8	8
A16	9	11	8	9	6	9	10	7	7

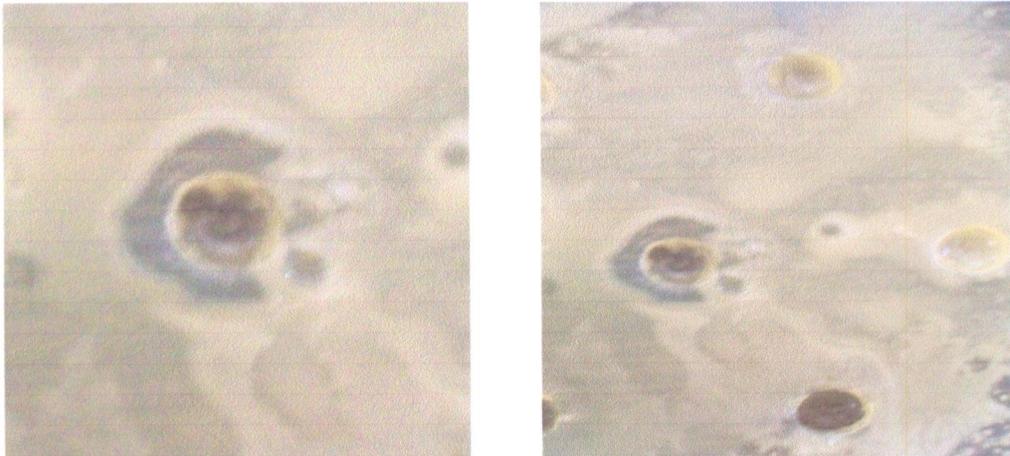
Pour la souche A16 elle donne les plus grandes zones d'inhibition à pH 7.5 vis-à-vis d'*E. coli* 16 et à pH 7 et 5.5 vis-à-vis de *P. aeruginosa* et à pH7 vis-à-vis de SARM.

Pour la souche 19 elle donne les plus grandes zones d'inhibition à pH 5.5 vis-à-vis d'*E. coli* 16 et à pH 7.5 et 5.5 vis-à-vis de *P. aeruginosa* et à pH 7 vis-à-vis de SARM.

## Résultats et discussion

---

La plus grande zone d'inhibition a été observée à pH 7.5 de la souche 16 contre *E. coli* 16. Bien qu'une zone d'inhibition des plus remarquables parmi celles des expériences sur milieu liquide par technique des puits, a été observée sur pH 5,5 de la souche A 16 contre la *SARM* (photographie n° 12).



**Photographie n° 11 :** Zone d'inhibition de la souche A16 contre la *SARM* à pH 5,5.

# Résultats et discussion

---

## 2- Discussion

Le but de cette étude est la mise en évidence des actinomycètes dans un sol d'un écosystème forestier et la sélection des souches qui ont une activité antimicrobienne. Pour cela le principal milieu d'isolement utilisé a été le Kuster-amidon, la sélection d'un milieu de culture adéquat est une étape nécessaire pour l'isolement des actinomycètes, ce milieu s'est avéré le meilleur milieu pour l'isolement des actinomycètes dans une étude de Vargas Gil et al. (2009) en comparaison avec d'autres milieux de culture (DNA: dextrose nitrate agar, GAA: glucose asparagine agar, AA: arginine agar, et GlyAA: glycerol arginine agar).

La plupart des actinomycètes peuvent utiliser une large variété de composés comme source d'énergie parmi lesquels le glucose, l'amidon, les acides aminés, les protéines, sont les plus utilisés. Les meilleures sources de nitrogène pour ces microorganismes sont protéines et peptones, acides aminés, nitrate, sels d'ammonium et l'urée mais utilisée à faible dose (Vargas Gil *et al.*, 2009).

Cependant, dans cette étude la plupart des actinomycètes se sont développés sur le milieu contenant les nitrates comme le Küster ou le DNA (Dextrose Nitrate agar), puis dans les milieux restants contenant les acides aminés comme sources de nitrogène (Vargas Gil *et al.*, 2009). Kuster était le seul qui comprenait la caséine, ce qui pourrait avoir favorisé le plus grand développement d'actinomycètes en comparaison avec les autres milieux, dont les sources de nitrogène étaient les acides aminés ou les nitrates, qui n'ont pas créé de différence pour la nutrition des actinomycètes (Vargas Gil *et al.*, 2009).

La présence, dans ce milieu, d'amidon et de caséine, stimulent la croissance des actinomycètes préférentiellement aux autres bactéries, favorisant ainsi leur récupération à partir des milieux naturels (Bouchachiche *et al.*, 2005).

Dans le passé plusieurs recherches concernant l'isolement sélectif des Streptomycètes du sol ont été menées, selon les chercheurs il n'existe pas de milieu idéal pour cet isolement, ainsi, la littérature propose un total de 21 milieux de culture recommandés (Küster et Williams, 1964).

En général, la chitine, l'amidon, le glycérol, l'arginine, l'asparagine, la caséine et les nitrates permettent un bon développement des Streptomycètes alors que les bactéries et les champignons poussent faiblement. L'utilisation de certaines sources de carbone et d'azote (amidon, chitine, glycérol, caséine, arginine, asparagine) rend les milieux moins favorables à la croissance des bactéries autres que les actinomycètes (Kitouni, 2007)

Dans les Milieux à la chitine, l'addition de chitine dans un milieu pauvre améliore un peu le développement des Streptomycètes et l'ajout de sels permet l'isolement d'actinomycètes de l'eau (*Streptomyces*, *Nocardia*, *Micromonospora*) (site1).

Dans les milieux avec amidon, caséine et nitrate comme le Kuster-amidon; l'amidon est dégradé comme la chitine par la plupart des Streptomycètes. La combinaison de l'amidon et du nitrate est particulièrement favorable à l'isolement de ces organismes (site1). Ceci est due à la présence d'enzymes de biodégradation de composés organiques naturels synthétisés par les actinomycètes jouant un rôle important en hydrolyse biologique, les protéases par

## Résultats et discussion

---

exemple, catalysent l'hydrolyse de protéines en acides aminés, les polysaccharides et les amidons sont dégradés pour libérer des sucres (Dierckx et Dewettink, 2002), les amylases par exemple sont produits par *Streptomyces sp*, *Thermoactinomyces vulgaris*, *Thermoactinomyces curvata* et *Saccharomonospora viridis*, les cellulases et les ligninases sont respectivement produits par les streptomycètes, et les espèces *streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces viridosporus* et *Streptomyces fusca* (Sanglier *et al.*, 1993; Mason *et al.*, 2001).

Les meilleurs milieux d'isolement sont ceux qui contiennent de l'amidon ou du glycérol comme principale source carbonée et de la caséine, de l'arginine ou du nitrate comme source d'azote. La paraffine est bien connue pour être dégradée par *Nocardia*, mais peu de renseignements sont disponibles sur son usage par les Streptomycètes; ce qui n'empêche pas leur isolement sur un tel milieu (site 1).

La sélection des actinomycètes doit passer par l'élimination des microorganismes envahissants gênant la croissance des actinomycètes. Par ailleurs, l'addition d'antifongiques et d'antibactérien contre les bactéries à coloration de Gram négative aux milieux de culture entraîne une augmentation du nombre des bactéries actinomycétales isolées (kitouni, 2007).

En effet le traitement de sol avant l'isolement par un séchage stockage et chauffage, utilise la grande résistance des arthrospores vis-à-vis des conditions de sécheresse et de températures ce qui conduit à une augmentation sensible du nombre de *Streptomyces* (kitouni, 2007), pour cette raison notre échantillon de sol a subi un traitement par un séchage à 37C° pendant 9 jours et un chauffage à 50 C° pendant une heure.

Un antifongique a été additionné la nystatine afin d'inhiber au maximum la croissance des champignons. Le seul antifongique utilisé dans notre étude pour l'isolement est la nystatine (50 mg/l), car parmi les antifongiques qui inhibent sélectivement la croissance des champignons et qui sont largement utilisés : le cycloheximide à 50-100 µg/ml, les polyènes pimarinine et la nystatine, chacun à 10-50 µg/ml (site 1). Dans une étude un milieu d'isolement Amidon-Caseine a été additionné de nystatine à 50mg/l et de l'acide nalidixique à 10 µg/l pour l'isolement d'actinomycètes (Levadoux *et al.*, 2002, Mincer *et al.*, 2002).

Toutefois, cet antifongique n'a pas été complètement efficace puisque on a observé la croissance de formes mycéliennes typiques des champignons sur des boîtes Kuster d'isolement.

Des antibiotiques comme la polymixine à 5 µg/ml et la pénicilline à 1 µg/ml sont parfois employés mais ces deux molécules inhibent aussi quelques *Streptomyces* (site 1). Dans notre présent travail, la majorité des bactéries sont certainement éliminés au cours du séchage et chauffage des échantillons, puisque très peu de bactéries autres que des actinomycètes ont été observées au cours de l'isolement, toutes les bactéries isolées avaient de fins filaments autour des colonies.

D'autres substances peuvent également être utilisées comme antibiotiques, comme le propionate de sodium à 4 g/l et le rose bengale à 35 mg/l qui de plus colore les colonies de Streptomycètes en rose intense (site 1).

D'après la littérature, selon la couleur des spores, il est possible de définir 7 séries des streptomycètes: Gris (de gris à brun), Blanc, Rouge (bronze, rose et rose pâle), Jaune (jaunâtre à jaune-verdâtre), Bleu (bleuâtre à bleu-grisâtre pâle), Vert (verdâtre à gris-verdâtre pâle) et

## Résultats et discussion

Violet (site 1). Certaines espèces des Streptomycètes peuvent être reconnues selon la couleur des mycéliums:

<b>Couleur du mycélium substrat</b>	<b>Espèces représentatives</b>
Orange à rouge foncé (surtout endo-pigment)	<i>S. aurantiacus</i> , <i>S. cinnabarinus</i> , <i>S. griseoruber</i> , <i>S. longispororuber</i> ,
Rouge à bleu/violet (surtout endo-pigment)	<i>S. californicus</i> , <i>S. cinereoruber</i> , <i>S. purpurascens</i> , <i>S. violaceus</i> .
Rouge-violet à bleu (endo et/ou exo-pigment)	<i>S. coelicolor</i> , <i>S. cyaneus</i> , <i>S. lateritius</i> , <i>S. violaceoruber</i> .
Jaune-orange/jaune verdâtre (endo et exo-pigment)	<i>S. atroolivaceus</i> , <i>S. canarius</i> , <i>S. galbus</i> , <i>S. flavogriseus</i> , <i>S. parvus</i> , <i>S. tendae</i> .
Vert à gris-olive (surtout endo-pigment)	<i>S. flavoviridis</i> , <i>S. olivoviridis</i> , <i>S. nigrifasciens</i> , <i>S. viridochromogenes</i> .
Vert (endopigment)	<i>S. malachiticus</i> , <i>S. malachitorectus</i> ,
Rouge-brun à brun foncé (endo et exo-pigment)	<i>S. badius</i> , <i>S. eurythermus</i> , <i>S. ramulosus</i> , <i>S. griseorubiginosus</i> , <i>S. phaeochromogenes</i> ,
Gris-brun à noir (surtout endo-pigment)	<i>S. alboniger</i> , <i>S. hygrosopicus</i> , <i>S. mirabilis</i> <i>S. purpureofuscus</i> , <i>S. violaceoniger</i> ,

Certaines souches sont même reconnues par la couleur des mycéliums aériens:

<b>Couleur du mycélium aérien</b>	<b>Espèces représentatives</b>
Jaune-gris "griseus"	<i>S. griseus</i> , <i>S. niveus</i>
Rose/violet clair	<i>S. fradiae</i> , <i>S. toxytricini</i>
Gris-rose/lavande "cinnamomeus"	<i>S. lavendulae</i> , <i>S. flavotricini</i>
Brun (+ gris ou rouge)	<i>S. eurythermus</i> , <i>S. fragilis</i>
Bleu "azureus"	<i>S. viridochromogenes</i> , <i>S. cyaneus</i>
Bleu-vert "glaucus"	<i>S. glaucescens</i>
Vert "prasinus"	<i>S. prasinus</i> , <i>S. hirsutus</i>
Gris "cinereus"	<i>S. violaceoruber</i> , <i>S. echinatus</i>
Blanc "niveus"	<i>S. albus</i> , <i>S. longisporus</i>
Non définissable : blanc + couleurs pâles variées (site 1)	<i>S. alboniger</i> , <i>S. rimosus</i>

Ainsi la majorité des souches isolées peuvent être rapprochées au genre Streptomycètes grâce à leurs aspects morphologiques et les couleurs du mycéliums substrats (photographie n°). Le nombre d'espèces appartenant aux streptomycètes est en augmentation continue, en 1997, 464 espèces sont validées et 45 sous espèces ont été recensées (Hain *et al.*, 1997), en septembre 2002 plus de 650 espèces sont conservées dans la collection allemande de microorganismes (DSMZ). Ainsi le genre *Streptomyces* est le plus grand genre de l'ordre des *Actinomycetales* dans la classe des *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). La classification des streptomycètes était à l'origine basée sur les caractères morphologiques et biochimiques, plus tard sur les tests physiologiques (Kutzner, 1986, Williams *et al.*, 1983, Goodfellow *et al.*, 1987, Kampfner *et al.*, 1991). Leurs caractérisations morphologiques et physiologiques sont menées suivant les directives données par l'ISP (International

## Résultats et discussion

---

Streptomyces Project). Les méthodes sérologiques, la lysotipie, le profil protéique, l'application des techniques génétiques telles l'hybridation ADN-ADN et l'analyse des séquences du gène de l'ADNr 16s sont également utilisés (Kitouni, 2007).

Toutefois, sachant que l'identification des souches n'a pu être complètement effectuée, il est impossible de confirmer l'identité des souches grâce au simple aspect macroscopique et aux tests biochimiques.

Le principal genre des actinomycètes *Streptomyces* représentent le genre majoritaire (95.34%) (Saffroy, 2006). Les germes du genre *Streptomyces* sont filamenteux, forment un mycélium très ramifié, qui a maturité, forme un mycélium aérien qui produit des chaînes de spores de longueur variable (photographie n°6). Ce sont des bactéries aérobies, à Gram positif, catalase positive. Tous nos isolats sont aérobie, Gram positive et catalase positive.

La plupart des souches isolées répandent une odeur, le plus souvent terreuse ou de moisi. Ces odeurs sont surtout présentes chez les espèces à mycélium végétatif abondant et poudreux. Il pourrait s'agir d'amines organiques (solubles dans l'éther) et leur formation serait plus abondante dans les milieux contenant du glycérol (site 1).

L'absence de la production de la mélanine est peut être due au milieu de culture inapproprié (à base de tyrosine, Glycérol, L-asparagine,  $K_2HPO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ , NaCl,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  et une solution d'oligo-éléments). La mise en évidence de la mélanine peut se faire soit par un milieu à base de peptone-extrait de levure-fer et/ou sur un milieu gélosé à la tyrosine (site 1). Dans une étude un milieu de culture; l'ISP6 à base de peptone-extrait de levure-fer n'a pas donné de résultat positif malgré l'isolement de souches colorées en gris violet ou marron (Ceylan *et al.*, 2008) . Dans des travaux de Forar laidi *et al.*(2008) une souche de streptomycète (SK4-6) n'a pas montré de production de pigments sur l'ISP 6 et l'ISP 7 (Forar laidi *et al.*, 2008).

Cependant dans une étude de Kitouni, la production de pigments mélanoides est mise en évidence dans l'ISP 6 (à base de peptone, extrait de levure, protéose peptone, citrate de fer ammoniacal , thiosulfate de sodium et le  $K_2HPO_4$ ) et l'ISP7 (à base de Glycérol, L-asparagine,  $K_2HPO_4$ , NaCl et le  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ), 2 souches ont pu produire des pigments bruns et jaunes sur l'ISP 6 mais pas sur le l'ISP7, milieu dont la composition est similaire au notre. Il est à noter que la composition du milieu à la tyrosine risque de changer prochainement car il semble que la tyrosinase soit induite par certains acides-aminés comme la L-méthionine ou la L-norleucine mais pas par son propre substrat (site 1).

D'un échantillon de sol on a pu isoler et purifier 22 souches d'actinomycètes. Les 22 souches ont été testées pour leurs activités antimicrobiennes par la technique des cylindres d'agar; toutes les souches isolées ont une activité antibactérienne vis-à-vis d'au moins une bactérie test, 13,63 % des isolats ont une activité antifongique et 45 % ont une activité antilevurienne. Donc notre activité antibactérienne est prédominante par rapport à l'activité antifongique et antilevurienne.

Des diamètres de zones d'inhibition supérieurs à 8 mm nous permettent de dire que le milieu utilisé a favorisé la production d'antibactériens par les isolats, ce qui explique qu'ils peuvent faire l'objet d'éventuelles études de production de substances bioactives.

## Résultats et discussion

---

Il est important de signaler que les paramètres physico chimiques des échantillons d'isolement sont essentiels pour l'explication des résultats et la prédominance des types de souches isolées. Généralement, l'activité antifongique est prédominante chez des actinomycètes isolés de milieux acides (Boughachiche *et al.*, 2005), et comme le pH de notre échantillon est neutre cela explique la prédominance de l'activité antibactérienne chez les actinomycètes isolés.

La majorité des souches bactériennes tests sont résistantes aux antibiotiques utilisés. Les souches A13 et A19 montrent une bonne activité contre *S. aureus* ATCC 25923 et la SARM, cette souche est une cause majeure d'infections nosocomiales, d'intoxications alimentaires, d'ostéomyélite, de polyarthrites, d'endocardites et de beaucoup d'autres syndromes. La SARM est responsable de larges épidémies d'infections acquises à l'hôpital que le monde n'ai jamais connu, elle est la plus populaire des bactéries résistantes hospitalières. Plusieurs souches de *S.aureus* sont déjà résistantes à tous les antibiotiques (Ceylan *et al.*, 2008).

Le *R. miehei* dont les A 16 et 19 montrent une grande activité est un champignon pathogène chez les bovins. Il a été signalé comme une cause de mammites bovines (Scholer *et al.*, 1983).

Afin d'étudier l'influence du milieu de culture sur la production des substances antimicrobiennes les deux milieux de culture liquide Kuster et Bennett ont été ensemencés par trois souches d'actinomycètes représentatives des isolats.

Dans une étude l'activité antimicrobienne s'est prononcée après 24 h de croissance avec un maximum à 72 h d'incubation. Cette activité reste stable entre 72 et 96 h, puis diminue lentement pour disparaître après 140 h d'incubation (Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2006)

Le pH des deux milieux atteint des valeurs basses surtout dans le Bennett au bout de 3 à 4 jours ce qui est en accord avec les résultats obtenus par (Ben Ameer Mehdi *et al.*, 2006), donc l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes est testée au quatrième jour.

La production maximale de la biomasse a été obtenues sur le milieu Bennett dont la source de carbone est le glucose (sucre simple) facile à consommer par les souches d'actinomycètes par contre la source de carbone de milieu kuster est l'amidon (sucre complexe) dont la décomposition en élément facilement consommables par les souches d'actinomycètes est nécessaire. Plus les molécules sont complexes, plus leur assimilation demanderait un coût énergétique important. Ainsi, les carbohydrates ayant une structure simple permettraient une formation de biomasse plus importante que ceux à structures plus complexes (Strub, 2008).

Le milieu Bennett est très riche en acide aminés apporté par (peptone, extrait de levure, extrait de viande) par contre pour le milieu kuster les acides aminés sont apportés seulement par la caséine, aussi le Kuster est un milieu complexe, ce qui implique qu'il peut contenir quelques composés inconnus qui peuvent interférer avec l'absorption d'autres composés (Vargas *et al.*, 2009). Une mole d'acide aminé consommée permet la production de deux fois plus de biomasse que la consommation d'une mole de glucose (Strub, 2008).

Ce qui explique l'obtention de la production maximale de la biomasse dans le milieu Bennett. Ceci est en étroite corrélation avec les données bibliographiques (Kitouni *et al.*, Barakat *et al.*, 2002).

## Résultats et discussion

---

L'activité antibactérienne la plus élevée des souches d'actinomycètes a été généralement observée sur le milieu Bennett, ceci est confirmé par les résultats obtenus par (Kitouni, 2007). Le meilleur rendement du Bennett peut être expliqué par la richesse de la composition chimique de ce dernier, notamment la présence de l'extrait de viande et les acides aminés (Kitouni, 2007).

L'étude de la cinétique de croissance et de la production de molécules actives a montré que la sécrétion de l'activité biologique est étroitement corrélée avec la production de biomasse (Vargas Gil *et al.*, 2006) ce qui explique l'activité antibactérienne la plus élevée des souches d'actinomycètes obtenue sur le milieu Bennett qui a donné la production maximale de la biomasse.

L'activité antibactérienne des surnageants de culture pour le choix du milieu de culture testée au quatrième jour de l'incubation au bain marie, thermostat à agitation, n'a pu être détectée par la technique des puits à cause certainement de la faible concentration des substances antibactériennes dans ce dernier. Selon Bushell *et al.* (6, 14), ce phénomène peut être expliqué par le fait qu'en milieu liquide et à cause de l'agitation, les filaments se fragmentent et les petits fragments se trouvent incapables de produire des quantités importantes d'antibiotiques (Reghioua *et al.*, 2008).

Les courbes obtenus concernant la cinétique de croissance et du pH sont en accord avec les résultats obtenus par Reghioua *et al.*, (2008) notamment, l'absence de la phase de latence et la diminution du pH de 7 à 4 dès le 2<sup>ème</sup> jour de culture. L'acidification du milieu peut être expliquée par une libération d'acides organiques.

La faible augmentation du pH chez la A16 est probablement due à la dégradation des sources azotées (Reghioua *et al.*, 2008). L'irrégularité observée des courbes de cinétique de croissance est certainement due au facteur agitation utilisé de façon discontinue.

La croissance en milieu liquide des Streptomycètes nécessite une aération du milieu par agitation, et/ou par injection d'air ou d'oxygène puisque ces bactéries sont aérobies strictes. Ces bactéries croissent par élongation des filaments et peuvent par la suite présenter trois types de morphologie (figure 3) : les hyphes, branchées ou non, sous forme de mycélium plus ou moins ramifiée formant des enchevêtrements ou encore des pelotes denses dont la taille peut varier de 0.1 µm à plusieurs millimètres, ces pelotes peuvent donner lieu à des limitations de transfert d'oxygène et/ou des nutriments du milieu de culture vers les bactéries se trouvant à l'intérieur de la pelote (Soffroy, 2006).

En conclusion ces résultats nous ont incité à sélectionner le Bennett pour l'étude de l'influence de la valeur du pH sur l'activité antimicrobienne. Les deux souches d'actinomycètes A16 et A19 ont montré une activité antibactérienne dans les trois valeurs de pH (pH 7, pH 7.5 et pH 5.5).

Le pH du milieu de culture qui a permis d'obtenir la meilleure activité antibactérienne des souches d'actinomycètes varie d'une souche test à une autre et d'une souche d'actinomycètes à une autre, cela a été observé aussi par Boughachiche *et al.*, 2005. Les variations de zones de lyse sont dues au fait qu'une souche d'actinomycète peut produire plusieurs molécules antimicrobiennes (différents spectres d'action) dont la nature dépend de la composition du milieu de culture.

## Résultats et discussion

---

Le pH 5.5 a permis l'apparition de la zone d'inhibition la plus importante par technique des puits, parmi les tests des activités antibactériennes à partir des surnageants. Dans une étude de l'optimisation de la production de l'oxytétracycline (OTC) par *Streptomyces rimosus*, ce germe a montré une capacité à produire de l'OTC qui a une activité antibactérienne vis-à-vis des bactéries Gram+ et Gram-. L'intensité de cette activité est dépendante de la source de carbone. En effet, elle est optimale si la souche est cultivée sur un milieu à base de son d'orge à pH 5.8 sous une agitation de 150 rpm/min à 28°C (Zouaghi, 2007).

La production du pigment diffusible lors de la cinétique de la croissance et du pH de la souche A20 dans le milieu Bennett, est certainement due à la production de substances bioactives. La libération de pigments est en général en relation avec la production d'antibiotiques, la souche génétiquement connue *S. coelicolor* A3(2) produit l'antibiotique bleue rouge indicateur de pH actinorhodine, mais le pigment bleue libéré n'est pas toujours l'actinorhodine, sa production optimale est à pH 6-7.5 (Leonid *et al.*, 1996).

# *Conclusion*

### **Conclusion :**

Afin de sélectionner des souches d'actinomycètes productrices des substances antimicrobiennes d'un écosystème forestier un protocole d'isolement des actinomycètes à partir d'échantillon du sol a été adopté.

Pour favoriser la croissance des actinomycètes et éliminer les microorganismes gênant leur croissance, le sol a subi un prétraitement par le séchage et le chauffage

Ainsi, le milieu Kuster est le milieu utilisé pour l'isolement additionné d'un antifongique; la nystatine et a permis l'isolement de 22 souches d'actinomycètes, qui ont été purifiées et testées pour leurs activités antimicrobiennes.

Toutes les souches d'actinomycètes isolées possèdent au moins une activité antibactérienne contre une des souches tests, seules trois souches ont une activité antifongique soit 13,63 % des isolats et 10 souches ont une activité antilevurienne soit 45 % des isolats. Donc l'activité antibactérienne des actinomycètes isolés est prédominante par rapport à l'activité antifongique et antilevurienne.

Dans ce travail, on a montré qu'une majorité de souches isolées ont la capacité de produire des composés antimicrobiens contre différents microorganismes, surtout des souches résistantes aux antibiotiques à Gram positive et à Gram négatif, et contre des champignons pathogènes.

L'influence de milieu de culture sur la production des substances antimicrobiennes par trois souches d'actinomycètes a été étudiée.

Parmi les deux milieux de culture liquide Kuster et Bennett, le milieu Bennett a donné la production maximum de la biomasse et l'activité antibactérienne la plus élevée.

L'étude de l'influence du pH du milieu sur la production des substances antimicrobiennes par deux souches d'actinomycètes a été établie sur le milieu Bennett.

Le pH du milieu de culture qui a permis d'obtenir la meilleure activité antibactérienne des souches d'actinomycètes vari d'une souche test à une autre et d'une souche d'actinomycètes à une autre.

En perspectives, il serait nécessaire de continuer l'étude par l'identification des souches isolées par des tests plus approfondies, de déterminer les métabolites actifs produits des isolats par la purification complète des molécules produites en utilisant des techniques chromatographiques et de déterminer leurs structures par l'utilisation de plusieurs techniques spécifiques comme la spectroscopie de masse et la résonance magnétique nucléaire.

*Références bibliographiques*

### ***Les références bibliographiques :***

- **Awad G., (2005).** Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez *aspergillus ochraceus* non producteur de l'ochratoxine A. Thèse de doctorat. Canada.
- **Aouar L., (2006).** Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Thèse de doctorat. Constantine.
- **Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. H. and Beaulieu C., (2002).** Characterization of rhizospheric soil *Streptomyces* from Moroccan habitats and their antimicrobial activities.18: 49-54.
- **Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L. et Zerizer H., (2005).** Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la sebkhia d'Ain Mlila. Sciences & Technologie. 23 : 5-10.
- Ben Ameer R., Sioud S., Fourati Ben Fguira L., Bejar S. et Mellouli L., (2006).** Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Process Biochemistry* .41: 1506–1513.
- .-**Ben Ali A., (2007).** Détection de Résidus d'antibiotiques dans les aliments par une méthode microbiologique. Thèse de doctorat.
- Bouras N., (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de doctorat. 2294.
- **Boultif L., (2009).** Optimisation des paramètres de détection et de quantification des Résidus d'antibiotiques dans le lait par chromatographie liquide haute performance (HPLC).29: 1-125.
- Ceylan O., Okmen G. et Ugur A.,(2008).** Isolation of soil *Streptomyces* as source antibiotics active against antibiotic-resistant bacteria. *EurAsia J BioSci.* 2 : 73-82.
- Chorin A.C., (2009).** Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* . Thèse de doctorat .
- Choulet F., (2006).** Evolution du génome des *Streptomyces* : transfert horizontal et variabilité des extrémités chromosomiques. Thèse de doctorat. Paris .
- **Colombié V., (2005).** Description de la production de spiromycine par *streptomyces ambofaciens*.modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de doctorat. 807 :174.
- Delery L., (1999).** antibioresistance bacterienne dans l'eau : problématique de la transmission de l'animal a l'homme .
- Desjardin V., (2002).** Réduction du chrome (VI) par la souche *Streptomyces thermocarboxydus* NH50 isolée à partir d'un sol pollué. 02 ISAL 0030, 9-11.
- Djambala C.A., (2010).** Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la Sebkhia de Ain M'lila. 307: 4-72.
- François B., (2005).** Cristallographie de complexe entre site de codage ribosomique et antibiotiques de la famille des aminoglycosides. Thèse de doctorat .Strasbourg.

- **Forar laidi R., Sifour M., Sakr M. et Hacene H., (2008).** A new actinomycete strain SK4-6 producing secondary metabolite effective against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *World J Microbiol Biotechnol.* 24: 2235–2241.

- **Goodfellow M., and Simpson K. E., (1987).** Ecology of streptomycetes. *Front. Appl. Microbiol.* 2: 97-125.

- **Hain T., Ward-Rainey N., Kroppenstedt R. M., Stackebrandt E. and Rainey F. A., (1997).** Discrimination of *Streptomyces albidoflavus* strains based on the size and number of 16S-23S ribosomal DNA intergenic spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 47: 202-206.

- **Hopwood D.A., Bibb M. J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C. P., Ward J.M. and Schremph H., (1985).** Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. Norwich.

- **Hopwood D.A., (1999).** Forty years of genetic with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico*. 145: 2183-2202.

- **Kutzner K. J., (1986).** The family *Streptomycetaceae*. In: Starr MP, Stolp H, Truper HG, Balows A, Schlegel HG The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria, vol. 2, Springer-Verlag, pp 2028-2090.

- **Kuster E et Neumeier W. (1981).** Halotolerance in some Streptomycetes producing tetracyclines. *Zbl. Bakt. Suppl.*, 1:1 5-3 1 9.

- **Kuster K., (1946).** The concept of genus and species within the *Actinomycetales* in: *Nocardia and Streptomyces: Gutar fisher Verlag.* 4: 21-25.

**Kampfer P., Kroppenstedt RM. and Dott W., (1991).** A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *J. Gen. Microbiol.* 137,1831-1891.

**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. Université Mentouri-Constantine.84.

- **Laureti L., (2010).** Activation of a silent type I polyketide synthase gene cluster in *Streptomyces ambofaciens* ATCC23877: isolation and characterization of a novel giant macrolide, Thèse de Nancy-université.

- **Leonid A. B., Fernandez-moreno M. A. et Herrema j.K., (1996).** Production of Actinorhodin-Related “Blue Pigments” by *Streptomyces coelicolor* A3(2). 8:2238–2244.

- **Larpen J. P., (2000).** Introduction à la nouvelle classification bactérienne. Paris. 56-58.

-**Leclerc H., Gaillaird J. L. et Simonet M., (1994).** Microbiologie générale : Les bactéries et les monde bactérien, Doin. Paris .

- **Lefebvre T., (2008).** Associations biologiques entre les termites du genre *Nasutiterme* et leur microflore actinomycétale:spécificité et évolution.Thèse de doctorat ,

- **Leveau J.Y., Bouix M.,( 1993).** Les microorganismes d'intérêt industriel, 2<sup>ème</sup> édition 42-544.

-**Mehmood N., ( 2011).** Effet de hydrodynamique et du transfert d'oxygène sur la physiologie de *Streptomyces pristinaespiralis* lors de culture en flacons agités. These. Paris.

-**Nekpen I. et Ogunmwoyi H ., (2010).** Assessment of antibiotic production by some Marine *streptomyces* isolated from the nahoon beach.

-**Ouhdouch Y., (2003).** Actinomycètes. Maroc .23-24.

-**Prescott L. M., Harley J. P. et Klein DA., (2003).** Microbiologie, 2<sup>ème</sup> Edition .Boeck ET l'acier française, p (808-817).

-**Roger P. et Garcia J.L., (2001).** Microbiologie du sol. Thèse de doctorat. Marseille.

- **Sanglier J. J. et Trujillo M., (1997).** Substances bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de sélection de souches. *Bull. Soc. Fr. Microbiol.*, 12-24.

- **Stackebrandt E., (2003).** The richness of prokaryotic diversity: there must be a species somewhere. *Food technol Biotechnol* 41: 17-22.

-**Saffroy S., (2006).** Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*.Thèse de doctorat . Institut National Polytechnique de Lorraine .

-**Singh L.S . Et Mazumder Set Bora T.C.,( 2009).** Optimisation of process parameters for growthand bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *Journal de Mycologie Médicale* 19 :225-233.

-**Smaoui S.,( 2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Constantine.

-**Strub C., (2008).** Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat .

-**Vargas Gil S., Pastor S. et March G.J., (2009).** Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma spp.*, *Gliocladium spp.* and actinomycetes from soil with culture media. *Rev. Microbiological Research* .164: 196-205.

- **williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H., Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. and Mortimer A. M., (1983).** A probability matrix for identification of some streptomycetes. *J. Gen.l Microbiol.* 129: 1815-1830

- **Voelker, F. et Altaba, S. (2001).** Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology*, 147, 2447-2459.

-**Von V. et Dangel V., (2009).** Biosynthesis of aminocoumarin antibiotics in-  
*Streptomyces*: Investigations on the regulation of novobiocin production.

- **Yala D., Merad A.S., Mohamedi D et Korich M.N., (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques .n° 29.

-**Yang S. X., Gao J. M., Zhang A. L. et Laatsch. H., (2011).** Sannastatin, a novel toxic macrolactam polyketide glycoside produced by actinomycete *Streptomyces sannanensis*. *REV.Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 21: 3905–3908.

- **Zaitlin B. et Watson S.B., (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water research*. 40: 1741 – 1753.

-**Zerizer H., Boughachiche A., kitouni A et Boudemagh H., (2006).** Identification d'une actinomycetale, productrice d'antibactériens, isolée de sols arides de la région de biskra . 24 17-22.

-**Zermane F., (2008).** Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose ,des substances pectiques et des composées organiques. Thèse de doctorat .

-**Zouaghi A., (2007).** Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par *Streptomyces*. 7 :31-53.

**Site web (1):**[htt://mcavalla.free.fr](http://mcavalla.free.fr).

**Les références de site :**

-**Girard et Rougieux, (1967).** Techniques de microbiologie agricole .

-**Bergey's manual of systematic bacteriology., (1989),**vol4,Stanly T. Williams ,Williams & Wilkins.

-**Prinzis S., (1990 ).** Isolement et caractérisation de souche d'actinomycétales .

Purification et étude structurale de leur métabolites antifongique, Thèse UCBL LYON 1.

-**Mertimer P .,(1989).** The prokaryotes ,vol II, Springer –Verag, chap 156.

# *Annexes*

## Annexe 1

**Composition des milieux de culture:**

- **Milieu de Bennett :**

Glucose	10 g
Extrait de levure	2 g
Peptone	2 g
Extrait de viande	1 g
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
pH 7,3	

- **Milieu de Kuster amidon**

Amidon	5g
Caséine	0,g
KNO3	2g
NaCl	2g
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	2g
Oligo-éléments	1ml
Agar	18 g
Eau distillée	1000 ml
PH 7	

- **Solution d'oligo-éléments :**

Sulfate de magnésium	5g
Carbonate de calcium	2g
Sulfate ferreux	1 g
Eau distillée	100 g

- **Milieu à la tyrosine pour test de la mélanine**

Glycérol	5 g
L-Tyrosine	0,5 g
L-Asparagine	1 g
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,5 g
NaCl	0,5 g

## Annexe

FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,01 g
Oligo-éléments	1 ml
Agar	20 g
Eau distillée	1000 ml
PH 7,2-7,4	

- **Solution d'oligoélément 1000x :**

FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1 g
MnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1g
ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0,1g
Eau distillée	100ml

- **Solution de Mc Farland 0,5:**

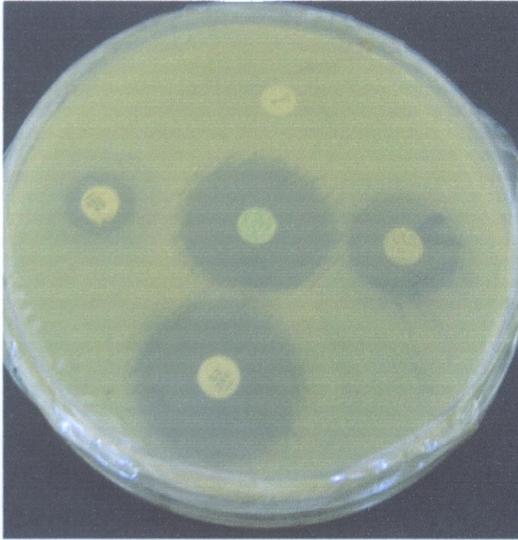
Le standard de 0.5 Mc Farland est préparé en mélangeant 0.05 ml de 1.175% chlorure de Barium di hydraté. (BaCl<sub>2</sub>•2H<sub>2</sub>O), avec 9.95 ml de 1% d'acide sulfurique.

- **Tableau de référence** des zones d'inhibition des antibiotiques (Streptomycine, Pénicilline G, Spiramycine, Céfotaxime, Compound sulphonamides) utilisées pour l'antibiogramme des souches tests.

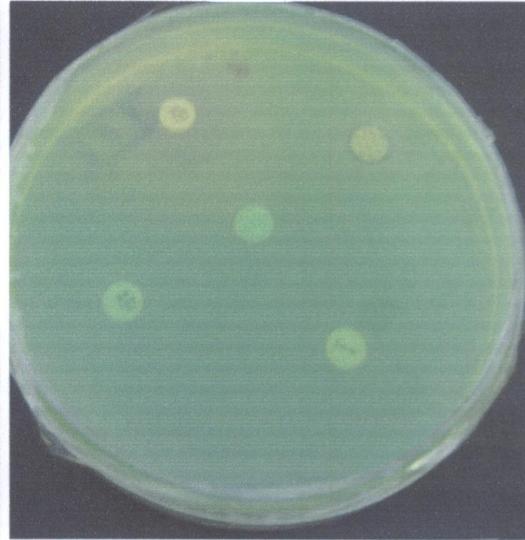
Antibiotique	Code	Charge	Diamètres des zones d'inhibition (mm)		
			R	I	S
Streptomycine	S <sub>10</sub>	10 µg	< 13	13-14	>16
Pénicilline G	P <sub>5</sub>	6-10µg	< 8	8-28	>29
Spiramycine	Sp <sub>100</sub>	100µg	< 16	16-21	>20
Céfotaxime	CTX	30µg	< 18	18-20	>21
Compound sulphonamides	S <sub>3</sub>	10µg	< 10	10-16	>16

Annexe 2

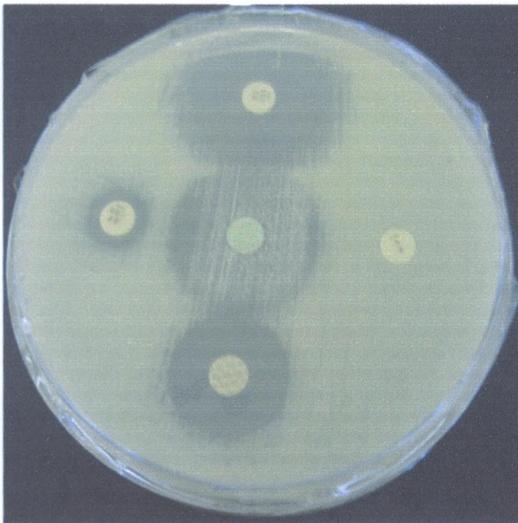
Photographies des résultats de l'antibiogramme des souches tests :



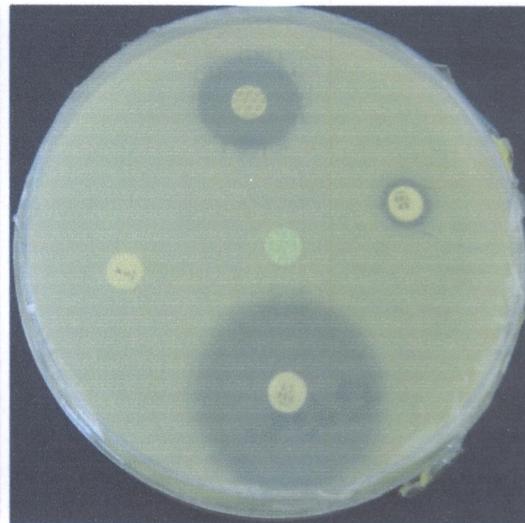
*E. coli* ATCC 25922



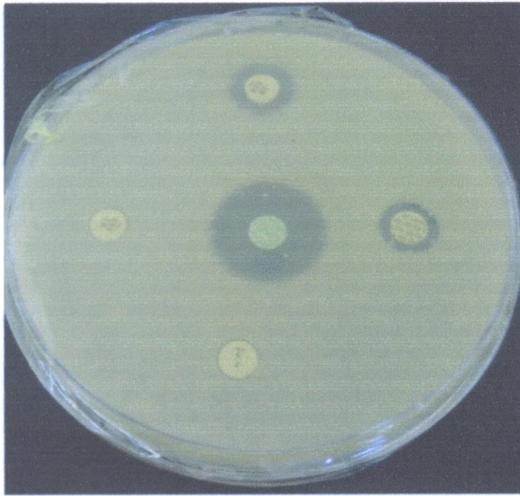
*Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853



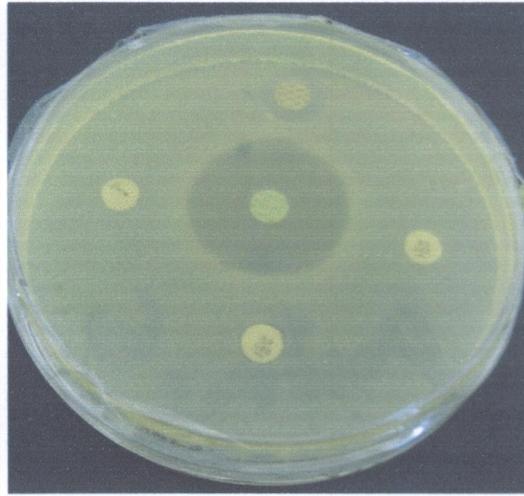
*Staphylococcus aureus* ATCC29523



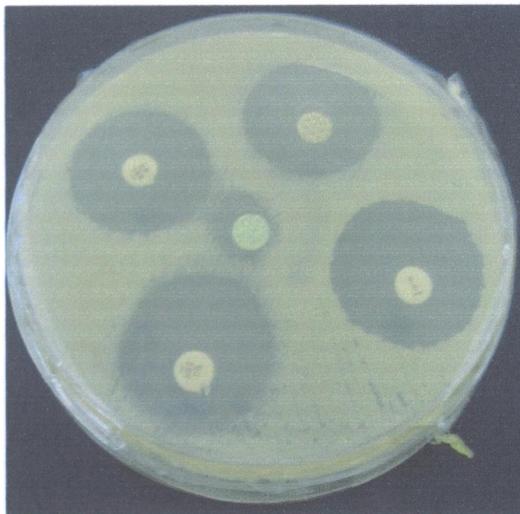
*Klebsiella pneumoniae*



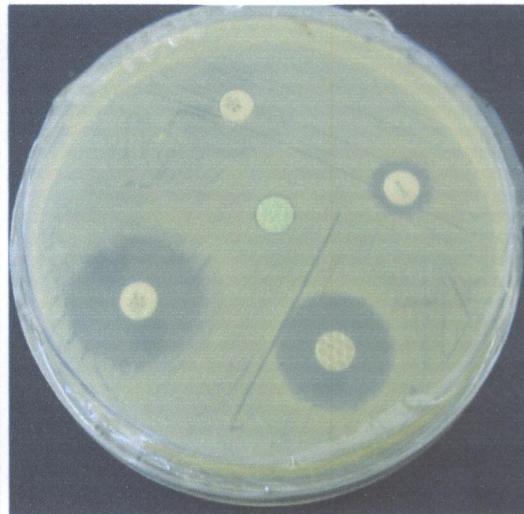
*E. coli 16*



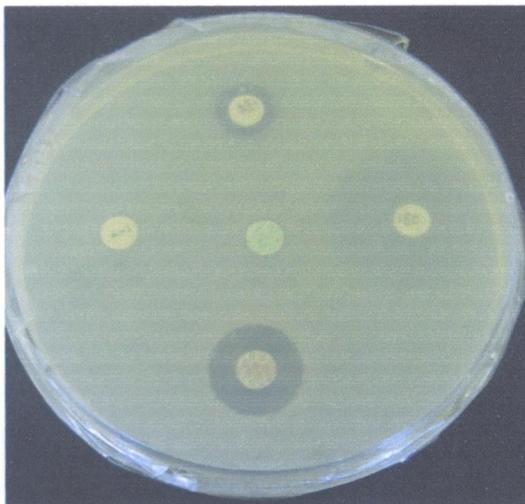
*Proteus mirabilis*



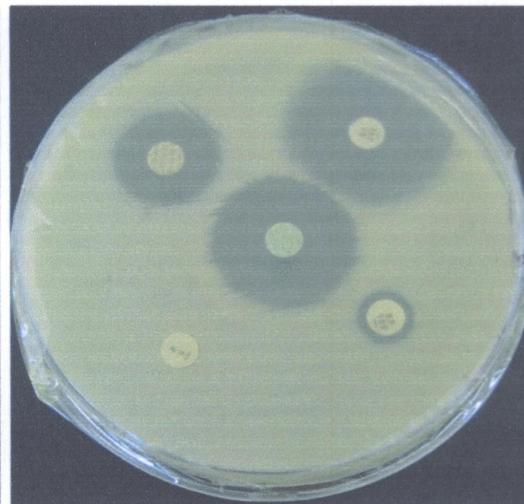
*Bacillus subtilis*



*Staphylococcus aureus* résistant à la  
Methicilline



*Salmonella* sp.



*Klebsiella oxytoca*

<b>Présenté par :</b> Daffess Nassira Blemrabet Manal	<b>Encadré par :</b> M <sup>lle</sup> Ajeroud Nawal	<b>Soutenu</b> Le 04. 07. 2011 A 9 :30
<b>Thème :</b>  <b>Isolement d'Actinomycètes producteurs de substances bioactives</b>		
<b>Résumé</b> 22 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sol forestier du parc de Taza à El-Aouana (Jijel). L'activité antimicrobienne a été effectuée contre trois bactéries Gram positives, sept bactéries Gram négatives, une levure et deux champignons filamenteux. Tous les isolats ont montré une activité contre au moins une bactérie-tests étudiées. L'influence de milieu de culture sur la production des substances antimicrobiennes a été étudié par culture des 3 souches isolées (A13, A16, A19) sur les deux milieux de culture liquide Kuster Amidon et Bennet ; l'activité antibactérienne la plus élevée des souches d'actinomycètes a été généralement observée sur le milieu Bennett. L'effet du pH sur la production des substances antibactériennes été étudié par culture des deux souches isolées (A16, A19) sur milieu Bennett liquide à différent (7, 7.5, 5.5) ; l'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes varie d'une souche d'actinomycètes à une autre. <b>Les mots clés :</b> isolement ,Actinomycètes, sol forestier, antibiotiques ,optimisation		
<b>Abstract</b> 22 strains of actinomycetes were isolated from samples of forest soil Park in El Taza Aouana (Jijel). The antimicrobial activity was carried out against three Gram-positive bacteria, seven Gram-negative bacteria, yeast and two filamentous fungi. All the isolates showed activity against at least one bacteria-testing study. The influence of culture medium on the production of antimicrobial substances was investigated by growing the three strains (A13, A16, A19) on both culture media and liquid starch Kuster, Bennet, the highest antibacterial activity of strains actinomycetes was generally observed in the mid Bennett. The effect of pH (7, 7.5, 5.5) on the production of antibacterial substances was studied by growing the two strains (A16, A19) on different liquid Bennett medium (7, 7.5, 5.5), the antibacterial activity of actinomycete strains vary from one test to another strain and a strain of actinomycetes has another. <b>Key words:</b> Isolation, Actinomycetes, forest floor, antibiotics, optimization.		
<p style="text-align: right;"><b>ملخص</b></p> عزل 22 سلالة من نوع الاكتينومييسات انطلاقا من عينات تربة غابة تازة (جيجل)، تم البحث على قدرة انتاج المضادات الحيوية بطرق انتشار المضادات الحيوية في البيئة المغذية ضد ثلاث سلالات بكتيرية موجبة الغرام و سبعة سلالات بكتيرية سالبة الغرام و خميرة واحدة واثنين من الفطريات الخيطية . كل سلالات الاكتينومييسات المدروسة اظهرت قدرتها على تثبيط نمو سلالة بكتيرية ممرضة واحدة على الأقل لقد تمت دراسة تأثير وسط الزرع على قدرة ثلاث سلالات (A19، A16، A13) على انتاج المواد المضادة للجراثيم باستعمال وسطين سائلين مختلفين هما Kuster Amidon و Bennet ، أعلى نشاط مضاد للجراثيم من سلالات الاكتينومييسات المعزولة لوحظ عموما في وسط الزرع Bennet كما تمت دراسة تأثير ودرجة حموضة الوسط Bennet على إنتاج مواد مضادة للجراثيم من طرف سلالتين من نوع الاكتينومييسات (A19، A16) في مختلف درجات الحموضة (درجة الحموضة7، درجة الحموضة 5.5 و درجة الحموضة7.5) نشاط سلالات الاكتينومييسات المضاد للبكتيريا الاعلى يختلف باختلاف سلالات الاختبار و باختلاف سلالات الاكتينومييسات الكلمات المفتاحية : الاكتينومييسات عزل ، تراب الغابة ، المضادات الحيوية .		