

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'Enseignement Supérieur Et de La Recherche Scientifique



Université de Ghardaïa

N° d'ordre :  
N° de série :

Faculté des sciences de la nature et de la vie et des sciences de la terre  
Département de Biologie

Projet de fin d'étude présenté en vue de l'obtention du diplôme de

## LICENCE

**Domaine :** Sciences de la nature et de la vie

**Filière :** Biologie

**Spécialité :** Biochimie

## Thème

**Recherche des milieux de culture solides menant à  
une production acceptable d'antibiotiques par des  
actinomycètes**

**Par :**

BENABDERRAHMANE Mordia

BELARAIS Assia

FACHA Imane

**Jury :**

**M. Belghit Said**

Maître Assistant A

Univ. Ghardaïa

**Encadreur**

**M. Kraïmat M**

Maître Assistant A

Univ. Ghardaïa

**Examinateur**

**Année universitaire 2013/2014**

## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mon exemple éternel, mon soutien moral et Source de joie et de bonheur, celui qui s'est toujours sacrifié pour me voir réussir, que*

*Dieu te garde dans son vaste paradis, à toi*

*mon père Amer.*

*À la plus belle créature que Dieu a créée sur terre,*

*À cet source de tendresse, de patience et de générosité,,*

*À ma mère Zohra*

*À mon frère Amine et À toutes mes sœurs Naïma, Zineb, Leïla,  
Khadîja et Meriem, ainsi que leurs enfants*

*À mon fiancé Aïssa*

*À mes parents et à toute la famille Belarais et Baba Amer  
Djelmam*

*À tous mes amies et collègues surtout IMANE, MORDIA et Faïza*

*À tous les étudiants de la promotion 2013/2014*

*Spécialité : biochimie*

*A tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer .....*

*Assia*





## *Dédicaces*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A la mémoire de mes grands-parents.*

*Aux deux personnes les plus aimées dans la vie*

*Mes très chers parents, ma mère **ZAINEB**, source de compassion et de tendresse, l'exemple de patience et sacrifice, la raison de mon existence et le support de ma vie.*

*A mon très cher père **OMAR**, l'homme le plus parfait dans le monde, mon grand exemple et secret de ma réussite.*

*Mes chères sœurs*

**YAMINA, DJAMILA, NAFIÇA, MERIEME**

*Et mes chers frères.*

**AZDINE, ABDENOOR, MOOAD**

*Qui m'ont toujours encouragée*

*A Toute ma famille **BENABDERRAHMANE** et **BENSAMOUNE**.*

*A Toutes mes amies **YASMINE, DHAIBA** surtout **ASSIA** et **IMANE***

*A Toutes mes collègues.*

*A Toute la promotion 3<sup>ème</sup> biochimie*

**mordia**





## *Dédicace*

*Je dédie ce modeste travail à :*

*A mes très chers parents **Rostom et Farida***

*Pour tout l'amour qu'ils me portent et pour leurs encouragements qu'ils m'ont apportés au cours de ce projet, je leur dédie ce travail en témoignage d'un grand amour et reconnaissance infinie, qu'ils trouvent ce travail en témoignage de ma profonde gratitude et mon infini dévouement*

*A mes frères **Abderahmane et Brahim***

*et mes sœurs **Fairouz, Wafaa, Aoutef***

*Pour votre soutien et encouragements, vous occupez une place particulière dans mon cœur. Je vous dédie ce travail en vous souhaitant un avenir radieux, plein de bonheur et de succès*

*A mes chers amies **Assia et Mordia***

*En souvenir de nos éclats de rire et des bons moments. En souvenir de tout ce qu'on a vécu Ensemble*

*A toutes la famille: **Facha et Abbas***

*Enfin, je dédie à tous ceux qui m'ont aidée et ont contribué de près ou de Loïn à la réalisation de Ce travail.*

***Imane***





## Remerciements

*Avent tout, nous remercions Allah le tout puissant de nous avoir accordé le courage et la patience pour terminer ce travail.*

*Nous tenons à remercier **Mr. Belghit Saïd** Maître Assistant à la faculté de Ghardaïa , promoteur de ce mémoire, de nous avoir encadré et orienté tout au long de ce travail, qu'il trouve ici l'expression de notre gratitude .*

*Nous tenons à remercier aussi à l'examineur **M.KRAIMAT M** pour son aide et conseils.*

*Notre reconnaissance et nos remerciements vont aussi à **BENSAMOUNE YOUSEF** .qui nous ont encouragés pour réaliser ce travail.*

*Ce travail a été réalisé au sein du laboratoire de Microbiologie à l'Université de Ghardaïa*

*Nous remercions toute l'équipe du laboratoire de microbiologie à l'université de Ghardaïa: **HICHAME ,MSAITFFA N, ....***

*Un grand merci à tous les enseignants de département de Biologie, qui n'ont ménagé aucun effort pour nous transmettre une parcelle de leur savoir,*

*Enfin, nous remercions fortement toute personne de près ou de loin qui a contribué à la réalisation de ce mémoire*



## Résumé

L'objectif de notre travail est de rechercher des milieux de culture solides favorables à la production d'antibiotiques secrétés par des actinomycètes. Pour cela, nous avons choisi deux milieux de culture complexes solides couramment utilisés pour l'étude morphologique des actinomycètes (ISP2) et (Bennett). Et à partir de ces milieux, nous avons créé huit autres, en soustrayant un composant ou plus de leurs compositions. Pour déterminer les meilleurs milieux nous avons mesuré l'activité antagoniste de la souche d'actinomycète (G61 ou B31) contre le germe test (*Candida albicans* ou *Bacillus subtilis*) dans chaque milieu de culture en utilisant la technique de la double couche. Nous n'avons pas remarqué une grande différence entre les activités apparues au milieu MA0 (ISP2) et ses milieux dérivés MA1, MA2, et MA3. Et ce pour les deux souches d'actinomycètes. Par contre, le fait inhibiteur des deux actinomycètes au milieu MB0 (Bennett) et ses dérivés MB1, MB2, MB3, MB4 et MB5 a enregistré certaines anomalies. En effet, la souche G61 a révélé une très bonne activité dans le milieu MB5 (à base de glucose et peptone) plus spécialement contre le germe test *Bacillus subtilis*. A son rôle la souche B31 a montré une bonne activité contre *Bacillus subtilis* dans le milieu MB3 et contre *Candida albicans* dans les milieux MB1 et MB2.

**Mots clés:** Milieu de culture, actinomycète, antibiotique

## ملخص:

الهدف من عملنا هذا هو البحث عن أوساط زراعية صلبة أكثر ملاءمة لإنتاج المضادات الحيوية المفترزة من طرف البكتيريا الهيفية. من أجل ذلك اخترنا وسطين زراعيين مركبين صلبين أكثر استعمالا في الدراسة المرفولوجية لهذه البكتيريا (ISP2) و (Bennett) الأفضل، قمنا بقياس النشاط التضادي لسلسلة الأكتينومييسات G61 أو B31 ضد سلسلة الاختبار *Candida albicans* أو *Bacillus subtilis* في كل وسط زراعي باستعمال تقنية الطبقة المزدوجة. لم نلاحظ اختلافا هاما في النشاط الظاهر في الوسط MA0 (ISP2) وكذا الأوساط المشتقة منه MA1، MA2، MA3. بخلاف ذلك لاحظنا اختلافا متباينا في النشاط في الوسط MB0 (Bennett) و الأوساط المشتقة منه MB1، MB2، MB3، MB4 و MB5. حيث أظهرت السلالة G61 فعالية كبيرة في الوسط MB5 خاصة ضد سلسلة الاختبار *Bacillus subtilis* و بدورها السلالة B31 أظهرت فعالية هامة ضد سلسلة الاختبار *Bacillus subtilis* في الوسط MB3 و ضد سلسلة الاختبار *Candida albicans* في الوسطين MB1 و MB2.

**كلمات مفتاحية:** وسط زراعي، بكتيريا هيفية، مضاد حيوي

## Liste des abréviations

|                |   |
|----------------|---|
| O <sub>2</sub> | Oxygène   |
| PCR            | Polymerase Chain Reaction                       |
| ANDr           | Acide désoxyribonucléique ribosomique           |
| ARDRA          | Amplified Rdna Restriction Analysis             |
| AND            | Acide désoxyribonucléique                       |
| MIB            | 2-méthyle isobornéol                            |
| pH             | potentiel hydrogène                             |
| DAP            | l'acide L-di aminopémilique                     |
| GC             | Cytosine, Guanine                               |
| ARN            | l'Acide Ribonucléique                           |
| NaCl           | Chlorure de sodium                              |
| ANC            | Acide Nalidixique-Colimycine                    |
| PLP            | Protéines Liant la Pénicilline                  |
| ISP2 (P2)      | Intrenational Streptomyses Project              |
| SSB            | Sartorius Stedim Biotech                        |
| LBSM           | laboratoire de biologie des systèmes microbiens |
| EN S           | l'Ecole Normale Supérieure                      |
| GN             | Gélose Nutritive                                |
| EV             | Extrait de viande                               |
| S              | <i>Streptomycestype</i>                         |
| EM             | Extrait des malt                                |
| B              | Bennett   |
| G              | Glucose   |
| EL             | Extrait de levure                               |
| P              | Peptone   |
| IPA200         | <i>Candida albicans</i>                         |
| HCl            | chlorure d'hydrogène                            |

|     |  |
|-----|--|
| ACA | Association coopération et aménagement |
| FSO | Food Safety Objective                  |



## Liste des tableaux

|            |   |    |
|------------|---|----|
| Tableau 1. | Sucre cellulaire d'actinomycètes                                  | 8  |
| Tableau 2. | Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat | 12 |
| Tableau 3. | Le spectre d'activité de quelques antibiotiques                   | 20 |
| Tableau 4. | Les milieux de culture solides utilisés                           | 23 |

## Liste des figures

|  |    |
|--|----|
| Figure 1. Aspect filamenteuse des colonies d'actinomycètes sous microscope   | 07 |
| Figure 2. Photographies au microscope électronique des différentes ascèses d'actinomycètes montrant la diversité des structures  | 07 |
| Figure 3. Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes   | 07 |
| Figure 4. Classification des actinomycètes basée sur l'analyse des séquences ARN16S  | 10 |
| Figure 5. Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i>  | 15 |
| Figure 6. Découverte et première utilisation clinique des principaux antibiotiques d'origine naturelle et d'origine synthétique  | 16 |
| Figure 7. Antibiotiques d'origine naturelle  | 17 |
| Figure 8. Antibiotiques d'origine synthétique  | 18 |
| Figure 9. Principaux sites d'action des antibiotiques  | 19 |
| Figure 10. Méthode de double couche  | 24 |
| Figure 11. Activité de la souche G61 contre les deux souches tests dans les dix milieux de culture choisis   | 25 |
| Figure 12. Photographies d'activité de la souche G61 contre les deux souches tests <i>Candida albicans</i> et <i>Bacillus subtilis</i> sur quelques milieux de culture | 26 |
| Figure 13. Activité de la souche B31 contre les deux souches tests dans les dix milieux de culture choisis   | 27 |
| Figure 14. Photographies d'activité de la souche B31 contre les deux souches tests <i>Candida albicans</i> et <i>Bacillus subtilis</i> sur quelques milieux de culture | 28 |

## Sommaire

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

### **I- Partie Bibliographique**

#### **I.-Données sur milieu de culture**

|   |   |
|---|---|
| 1. Définition.....  | 3 |
| 2.1-classification selon leur consistance .....   | 4 |
| 2.2-classification selon leur composition.....  | 4 |
| 2.2.1-un milieu complexe .....  | 4 |
| 2.2.2-un milieu synthétique.....  | 4 |
| 2.3.-classification selon leur utilisation.....   | 4 |
| 3.-Effect de la composition du milieu de culture sur la production des métabolites<br>secondaires ..... | 5 |
| 3.1.-la source de carbone.....  | 5 |
| 3.2.-la source d'azote .....  | 6 |

#### **II.-données sur d'actinomycètes.....**

|   |    |
|---|----|
| 1.-taxonomie des actinomycètes.....                 | 7  |
| 1.1.-critères morphologiques .....                  | 7  |
| 1.2.-critères chimiques.....                        | 9  |
| 1.3.-critères physiologiques des actinomycètes..... | 9  |
| 1.4.-taxonomie numérique.....                       | 10 |
| 1.5.-critères moléculaire actinomycètes.....        | 10 |
| 1.5.1.- Séquençage d'ARN16S.....                    | 10 |
| 1.5.2.- Hybridation ADN-ADN.....                    | 12 |
| 2.- Ecologie actinomycètes.....                     | 12 |
| 3.- Importance des actinomycètes.....               | 13 |
| 3.1.- Importance dans le domaine industriel.....    | 13 |
| 3.1.- Les cellulases.....                           | 13 |
| 3.2.- Les ligninases.....                           | 13 |
| 3.2.- Importance écologique.....                    | 13 |

|   |           |
|---|-----------|
| 3.3.- Importance Agronomie.....   | 13        |
| 3.4.- Autre importance.....   | 14        |
| 4.- Distribution des actinomycètes dans les sols Sahariens algériens..... | 14        |
| 5.- Le Genre Streptomyces.....  | 14        |
| <b>III.- Données sur les antibiotiques.....</b>                           | <b>16</b> |
| 1.Définition.....   | 16        |
| 2.-Les classifications déférentes des antibiotiques.....                  | 16        |
| 2.1.L'origine .....   | 17        |
| 2.1.1.- Antibiotiques naturelles.....                                     | 17        |
| 2.1.2.- Antibiotiques Semi-synthétiques.....                              | 18        |
| 2.1.3.- Antibiotiques de synthèse chimique totale.....                    | 18        |
| 2.2.- Mode d'action .....   | 18        |
| 2.2.1.- Effet sur la paroi bactérienne.....                               | 18        |
| 2.2.3.- Effet sur la membrane cellulaire.....                             | 19        |
| 2.2.4.- Effet sur les ribosomes.....                                      | 19        |
| 2.2.5.- Effet sur l'ADN.....  | 19        |
| 2.2.6.Autres.....   | 19        |
| 3.- Modalité d'action.....  | 20        |
| 4.-spectre d'activité.....  | 20        |
| 5.- La nature chimique.....   | 21        |

## II.-Matériels et Méthode

|   |           |
|---|-----------|
| <b>A-Matériel.....</b>                              | <b>22</b> |
| 1. Appareillage.....                                | 22        |
| 2.- Petit matériel.....                             | 22        |
| 3.- Produits chimiques.....                         | 22        |
| 4.- Les isolats d'actinomycètes.....                | 22        |
| 5.- Les germes cibles.....                          | 23        |
| 6.- Les milieux testés.....                         | 23        |
| <b>B- Méthodes.....</b>                             | <b>24</b> |
| Production d'antibiotiques sur milieux solides..... | 24        |

## III Résultats et Discussions

|                                 |           |
|---------------------------------|-----------|
| <b>Résultats.....</b>           | <b>25</b> |
| <b>Discussion.....</b>          | <b>29</b> |
| <b>Conclusion générale.....</b> | <b>32</b> |
| Référence Bibliographique.....  | 34        |
| Annexes                         |           |



# **INTRODUCTION**

## INTRODUCTION GENERALE

Depuis leur découverte au début du XX<sup>ème</sup> siècle, les antibiotiques ont permis de grandes avancées en thérapeutique et ont contribué à l'essor de la médecine moderne. L'utilisation en clinique des premières classes d'antibiotiques ont considérablement réduit la mortalité imputable à des maladies autrefois incurables. La majorité des antibiotiques sont produits par les actinomycètes (Elodie, 2010).

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, septées, ramifiées, à coloration de Gram positif (Nanjwad *et al.*, 2010), largement distribuées dans plusieurs environnements (Mincer *et al.*, 2002). La plupart d'entre elles se trouvent dans le sol, y jouant un rôle important dans la décomposition des matières organiques (Isabelle *et al.*, 2007).

La morphologie des différents groupes d'actinomycètes est très variable, elle va de formes peu évoluées comme *Mycobacterium*, à des formes très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant (Smaoui, 2010). Ces bactéries tiennent une très grande importance dans le domaine de la biotechnologie des antibiotiques malgré les progrès de synthèse chimique. En effet, 75% des antibiotiques connus sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces*. Elles sont capables de métaboliser plusieurs et différents composés (Benimeli *et al.*, 2003). Et sont l'un des plus attractives sources des nouveaux bioactive métabolites. C'est environ 70% de tous les médicaments connues ont été isolés à partir des actinomycètes et 60% sont utilisés dans le domaine d'agriculture (Pachaiyappan *et al.*, 2012).

Les milieux de culture offrent sous forme assimilable toutes les substances indispensable à la nutrition des actinomycètes dans des condition physico-chimiques optimales (Guezlane *et al.*, 2010 ). Le niveau de production des métabolites secondaires, notamment chez les actinomycètes, dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponible et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse (Anne *et al.*, 2009). Les antibiotiques sont des métabolites secondaires, et les deux facteurs les plus importants influençant leur production sont la nature du milieu de culture utilisé et les conditions de culture. Le milieu de culture doit contenir quantitativement et qualitativement non seulement les aliments exigés pour favoriser la croissance de la souche mais assurer également une production maximale de l'antibiotique (Larpent et Sanglier, 1989). Le choix de ces constituants (source carbonée, source azotée, et sels minéraux) est donc prépondérant pour la production des antibiotiques. Ces milieux ne sont pas universels et ils doivent être recherchés pour chaque actinomycète (Iwai et Omura, 1982 ; Thakur *et al.*, 2009).

Notre travail rentre dans cette optique, il a pour objectif de chercher des milieux de culture solides menant à une production acceptable d'antibiotiques actifs contre *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* par deux souches d'actinomycètes (*Streptomyces* sp. G61) et (*Streptomyces* sp B31) isolées des sols sahariens algériens par (Belghit, 2010).

La première partie de ce manuscrit aborde quelques notions bibliographiques relatives aux milieux de culture, actinomycètes et antibiotiques. La deuxième partie explique le matériel utilisé, les compositions de milieux de culture préparés et la méthode adoptée pour la mise en évidence des activités antagonistes. La troisième partie est consacrée à la description des résultats obtenus, leur comparaison et leur discussion. Une conclusion générale, les références bibliographiques et les annexes annoncent ainsi la clôture de ce manuscrit.

*PARTIE I*

**REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**





## **I.- Données sur les milieux de culture**

### **1.- Définition:**

Les milieux de cultures sont des préparation stériles, solides, semi solides ou liquides, utilisées pour faire croître, transporter ou conserver des micro-organismes (Guezlane *et al.*, 2010). Un bon milieu doit contenir tous les nutriments dont le micro-organisme a besoin pour se développer. Il faut des milieux spéciaux pour l'isolement, l'identification et la mesure de la sensibilité des micro-organismes aux antibiotiques (Prescott *et al.*, 2003).

### **2.- Classification des milieux de culture**

#### **2.1- Classification selon leur consistance**

Liquide: ne contenant pas d'agar agar ou gélose

Semi solide: contenant 0.5 à 0.75% d'agar agar

Solide: renfermant 1.5 à 2% d'agar agar

##### **2.1.1.- Le milieu liquide**

Par exemple le bouillon nutritif contenant soit des produit carné ou protéique; soit une solution riche en substances synthétique. Dans les deux cas la gélose est totalement absente. La croissance est réalisée dans des tubes; des ballons; ou erlenmeyers et elle est suivie par turbidimétrie (Guezlane *et al.*, 2010).

##### **2.1.2.- Le milieu nutritif solide**

Ce milieu peut être identique au précédent mais il contient de l'agar agar ou gélose. S'il renferme une proportion comprise entre 0.5 et 0.75 % de gélose ; on parle de milieu semi solide ; s'il y en a plus le milieu est solide. Cette substance extraite d'algues rouges (*Gelidium cartilagineux* ou *Gracilaria confervoïde*) a la propriété de solidifier les milieux liquides dans lesquels on l'incorpore; chimiquement c'est un polygalactoside commercialisé sous forme de poudre ou de granulés très largement employé en microbiologie; l'agar agar sert à gélifier tous les milieux de culture; ceux qui peuvent s'utiliser de plusieurs façons: gélose inclinée en tubes à essai; culot en tubes droits; ou couche mince en boîtes de Pétri. La culture sur milieu solide est utilisée pour l'isolement individuel des micro-organismes (en boîte de pétri) et pour leur conservation (gélose inclinée en tubes à essai) (Kahlouche *et al.*, 2010).

## **2.2- Classification selon leur composition**

Bien que tous les micro-organismes exigent une source d'énergie de Carbone, d'azote, de phosphore, de soufre et de divers minéraux, la composition précise d'un bon milieu dépend de l'espèce à cultiver car les besoins en élément nutritif sont très spécifiques. On distingue des milieux complexes et milieux synthétiques (Guezlane *et al.*, 2010).

### **2.2.1.- Un milieu complexe**

Les milieux qui contiennent des ingrédients de composition chimique indéterminée sont appelés milieux complexes. Ils sont très utiles, car un seul milieu complexe peut être suffisamment riche et complet pour satisfaire les besoins nutritifs de nombreux germes microbiens différents (Guezlane *et al.*, 2010). Les milieux complexes contiennent des composants indéfinis comme des peptones, des extraits de viande et des extraits levure. Les peptones sont des hydrolysats des protéines, elles servent de sources de carbone, d'énergie et d'azote. L'extrait de levure est extrait de levure de bière est une excellente source de vitamines B, aussi bien que de composés azotés et carbone (Prescott *et al.*, 2003).

### **2.2.2.- Un milieu synthétique**

un milieu synthétique ou défini peut être utilisé pour la culture de la plupart des microorganismes, Certains germes en particuliers les autotrophes photolithotrophes se multiplient sur des milieux assez simples contenant du CO<sub>2</sub> comme source de Carbone, source d'azote, phosphate et une série de minéraux (Guezlane *et al.*, 2010).

De nombreux hétérotrophes chimioorganotrophes sont aussi cultivés sur des milieux définis contenant du glucose comme source de carbone et un sel d'ammonium comme source d'azote (Prescott *et al.*, 2003). Ce type de milieu permet d'obtenir des résultats comparables et de déceler avec précision les modifications qu'il subit au cours du développement microbien (Aminetou *et al.*, 2008).

## **2.3.- Classification selon leur utilisation**

La classification des milieux de culture selon leur utilisation se divise sur quatre catégories: Les milieux usuels dits de base, milieux d'isolement, milieux d'identification et milieux de conservation (Guezlane *et al.*, 2008).

### **2.3.1. - Milieux usuels (milieux de base)**

Ce sont des milieux d'un emploi aussi général que possible. Cependant il n'existe pas de milieux de culture universels. Pour les bactéries, c'est la gélose nutritive. Ce milieu permet de cultiver la plupart des germes qui n'ont pas d'exigence particulières. Pour les champignons, le milieu Sabouraud. il convient très bien pour la culture des levures et les moisissures (Guemouri *et al.*, 2008)

### **2.3.2. - Milieux d'isoloment: peuvent être:**

#### **2.3.2.1. - Milieux sélectifs:**

Les milieux sélectifs favorisent la croissance d'un type bactérien particulier tout en inhibant les autres types (exemple des milieux sélectifs pour les bactéries à Gram positif contenant des antibiotiques inhibiteurs des bactéries à Gram négatif) (Marchandin, 2007).

#### **2.3.2.2. - Milieux non sélectifs:**

Milieu à utilisation générale permettant la croissance de la plupart des micro-organismes (Bahlaoui, 2006).

### **2.3.3.- Milieux d'identification**

Milieux servant à mettre en évidence un ou plusieurs caractères chez une souche microbienne précédemment isolée. Ils permettent de rechercher la fermentation d'un sucre, la production de gaz comme l'hydrogène sulfuré, ou bien de démontrer, la présence d'une nitratase, d'une désaminase, d'une gélatinase etc. Le milieu à l'extrait de malt, l'eau gélosée à 2 % etc sont utilisés pour l'identification des champignons (Gulezlane *et al.*, 2010).

### **2.3.4.- Milieux de conservation**

Ce sont des milieux pauvres qui maintiennent les microorganismes dans un état de vie ralentie (Gulezlane *et al.*, 2010).

## **3.- Effect de la composition du milieu de culture sur la production des métabolites secondaires**

La composition de milieu peut influencer la production des métabolites secondaires. En effet, il est couramment admis que la production des métabolites secondaires intervient lorsque la croissance se trouve limitée par l'un des substrats du milieu (Cheng *et al.*, 1995).

### **3.1.-La sources de carbone:**

L'amidon, la dextrine, le glucose et le saccharose sont communément utilisés comme des substrats de croissance pour produire des enzymes, des antibiotiques et d'autres métabolites



secondaires par la fermentation. Cependant, la production est fréquemment limitée ceci est dû à un effet négatif exercé par la source du carbone (Sanchez *et al.*, 2002).

### **3.2.-La source d'azote**

Comme la source de carbone, les niveaux élevés de l'azote répriment la production d'antibiotiques pendant l'iodophase (Junker *et al.*, 1998) . Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure. La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production (Marwick *et al.*, 1999). L'action de l'azote peut se situer au niveau du taux de croissance et au niveau plus direct de la formation ou du fonctionnement des enzymes responsables du métabolisme secondaire (Omura, 1986).

## II.- Données sur actinomycètes

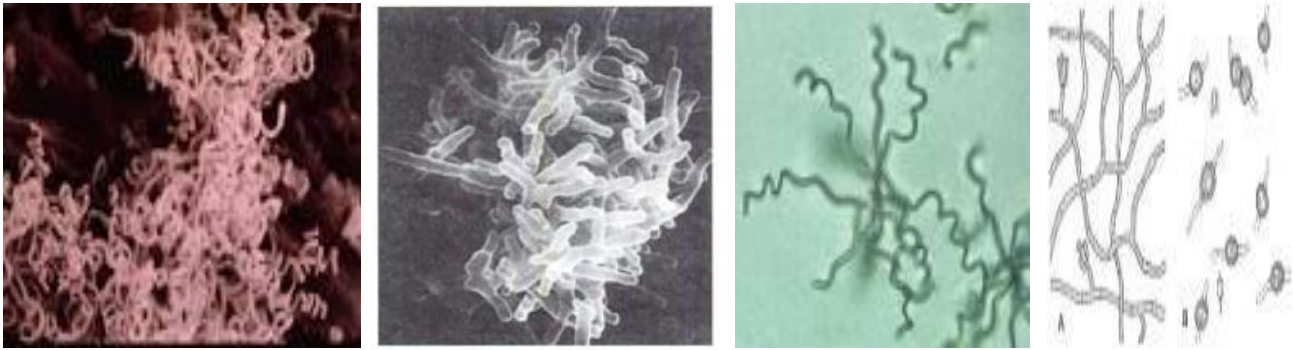
### 1.- Taxonomie des actinomycètes

Le mot actinomycètes provient de deux substantifs grecs et signifie « Champignons à rayons » ou « Champignons rayonnants ». Ils forment un ordre de bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés lesquels peuvent être assez développés pour former un véritable mycélium (Belghit, 2010). Les actinomycètes appartiennent au règne des Procaryotes, à la division des Firmicutes et à la classe des Thalobacteria, contenant l'ordre des Actinomycetales (Larpen, 2000). La taxonomie des actinomycètes est basée sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'utilisation d'approches évolutionnistes phylogénétiques et moléculaires a grandement aidé les méthodes de classification (Hozzein *et al.*, 2011).

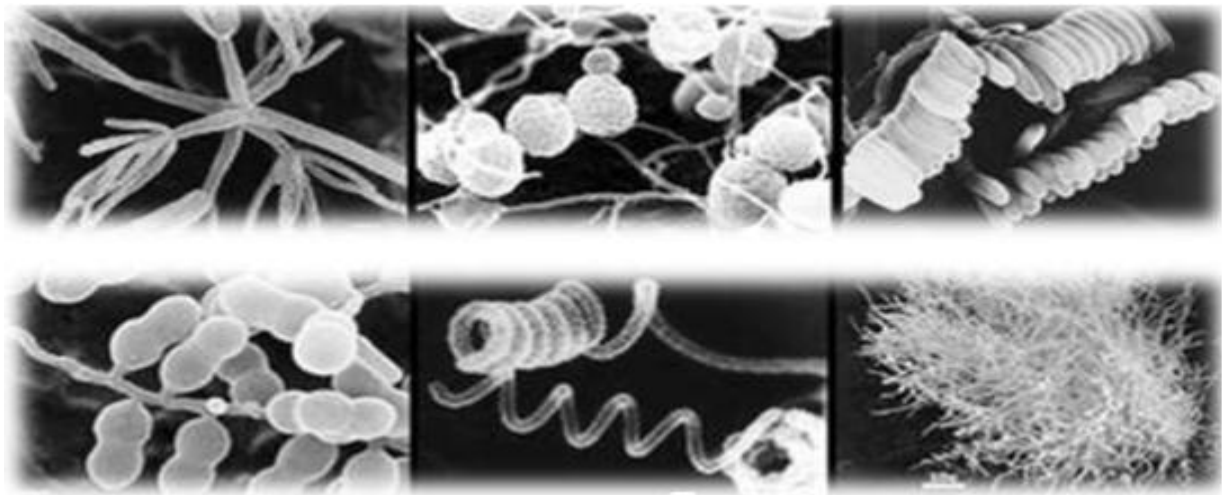
Des techniques plus nouvelles ont été appliquées à la taxonomie des actinomycètes. Les méthodes basées sur PCR avaient apporté une voie rapide et fiable pour l'identification des bactéries y compris les actinomycètes. Parmi ces méthodes ; analyse des fragments de restriction de l'ADNr (ARDRA: amplifie ADNr restriction analysis) (COOK *et al.*, 2003).

#### 1.1.- Critères morphologiques

Les actinomycètes sont un groupe de bactéries Gram positif. Ce sont des bactéries filamenteuses durant leur vie végétative (Isabelle *et al.*, 2007). La morphologie des différents groupes d'actinomycètes ont longtemps été considérés comme des champignons primitifs, du fait de leur mycélium, souvent à la fois aérien et pénétrant dans le substrat nutritif, du fait également de la fructification par sporanges libérant des spores chez nombre d'entre eux (Horinouchi, 2002). L'analyse par image des actinomycètes révèle la présence de deux catégories d'hyphes: Les hyphes dispersés et les hyphes en pellets. La première forme c'est des hyphes indépendants dispersés, la seconde est une masse ou agrégats de mycélium (Perry *et al.*, 2004). Les actinomycètes présentent des similitudes avec les eubactéries et les champignons. Il existe des formes de transition, mycéliennes typiques et unicellulaires, présentant une aptitude peu marquée à former un mycélium ramifié. 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. La plupart des actinomycètes sont terrestres, certaines espèces sont marines (Mincer *et al.*, 2002).



**Figure 1.** Aspect filamenteuse des colonies d'actinomycètes sous microscope (site électronique 1, 2, 3).



**Figure 2.** Photographies au microscope électronique des différentes ascèses d'actinomycètes montrant la diversité des structures (Thomas, 2008).

Les colonies qu'ils forment sur milieux solides sont caractéristiques, elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc ... (Perry *et al.*, 2004).



**Figure 3.** Coupe transversale d'une colonie d'actinomycètes (Prescott *et al.*, 2003).

## 1.2.- Critères chimiques

La composition chimique de la paroi cellulaire des actinomycètes a une valeur taxonomique élevée et elle varie fortement d'un groupe à l'autre. On peut distinguer quatre types principaux de paroi sur la base de trois critères caractérisant la présence et la structure de peptidoglycane, l'acide aminé en position 3 du térapeptide; la présence de glycine dans les ponts interpeptidique et le contenu en sucre du peptidoglycane (Prescott *et al.*, 2003).

D'autres éléments de la composition chimique sont aussi pris en considération pour une complète distinction entre les différents genres. Ces caractères sont représentés par la nature du peptidoglycane, des lipides (les acides gras, les ménaquinones et les phospholipides). Ainsi, cinq profils ont été définis sur la base de la nature des phospholipides (Lechevalier, 1981), et quatre profils sur la base de la nature des acides gras estérifiés au sein des phospholipides.

La plupart des actinomycètes possèdent une paroi cellulaire de type 1 à type 4 (tableau 1) avec des peptidoglycans contenant (l'acide L-diaminopimélique DAP) et glycine (type 1); méso DAP et glycine (type 2); méso DAP (type 3) ou méso DAP avec arabinose et galactose (type 4). Les extraits cellulaires des actinomycètes munis d'une paroi de type 2, 3, 4; c'est à dire les actinomycètes à acide diaminopimélique sont les seuls qui contiennent des sucres caractéristiques (arabinose; galactose; madurose; xylose) (Prescott *et al.*, 2003).

**Tableau 1.** Sucre cellulaire d'actinomycètes (prescott *et al.*, 2003 )

| Profil de sucre | Sucres caractéristiques | Genres représentatifs                                 |
|-----------------|-------------------------|---|
| A               | Arabinose; galactose    | <i>Nocardia, rhodococcus, Saccharomonospora</i>       |
| B               | Madurose                | <i>Actinomadura, Streptosporium, Dermatophilus</i>    |
| C               | Aucun                   | <i>Thermomonospora, Actinosynne, Geodermatophilus</i> |
| D               | Arabinose, xylose       | <i>Micromonospora, Actinoplanes</i>                   |

## 1.3.- Critères Physiologiques des actinomycètes

Au niveau du sol, les actinomycètes représentent l'une des principales communautés microbiennes. leur présence est significativement influencée par les conditions environnementales l'humidité, la température, le pH, la salinité, le type de sol, la profondeur dans le sol, la nature et l'abondance de la matière organique et la végétation du sol (Bacilio, 2003). En générale, les actinomycètes ont été isolés dans des sols contenant des taux faibles jusqu'à modérés d'humidité, ce qui suggère qu'il ne sont pas beaucoup influencés par les conditions semi-arides (Prescott *et al.*, 2007). La plupart des actinomycètes du sol sont neutrophiles et de croissent dans un intervalle de pH compris entre 5 et 9 avec un croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin et les

procédures d'isolement ont été traditionnellement basées sur ce caractère de neutralité (Lee *et al.*, 2002).

#### **1. 4.- Taxonomie numérique**

La classification qui tenait compte de l'ensemble des caractères d'un organisme. À la fin des années 1957 est suite au développement des techniques biochimiques analytiques, Sneath applique une méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux... (Smaoui, 2010). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude, les individus les plus semblables, les caractères métabolique et physiologique sont largement employés en taxonomie, même s'il est bien connu que ces caractères peuvent être différents pour des souches d'une même espèce. cette variabilité peut être expliquée aujourd'hui par les transferts de plasmides et les transferts de gène via les phénomènes de parasexualité tels que la conjugaison, la transformation et la transduction qui sont connus chez les procaryotes et qui passent la barrière d'espèce voire même de domaine (Nelson *et al.*, 1999).

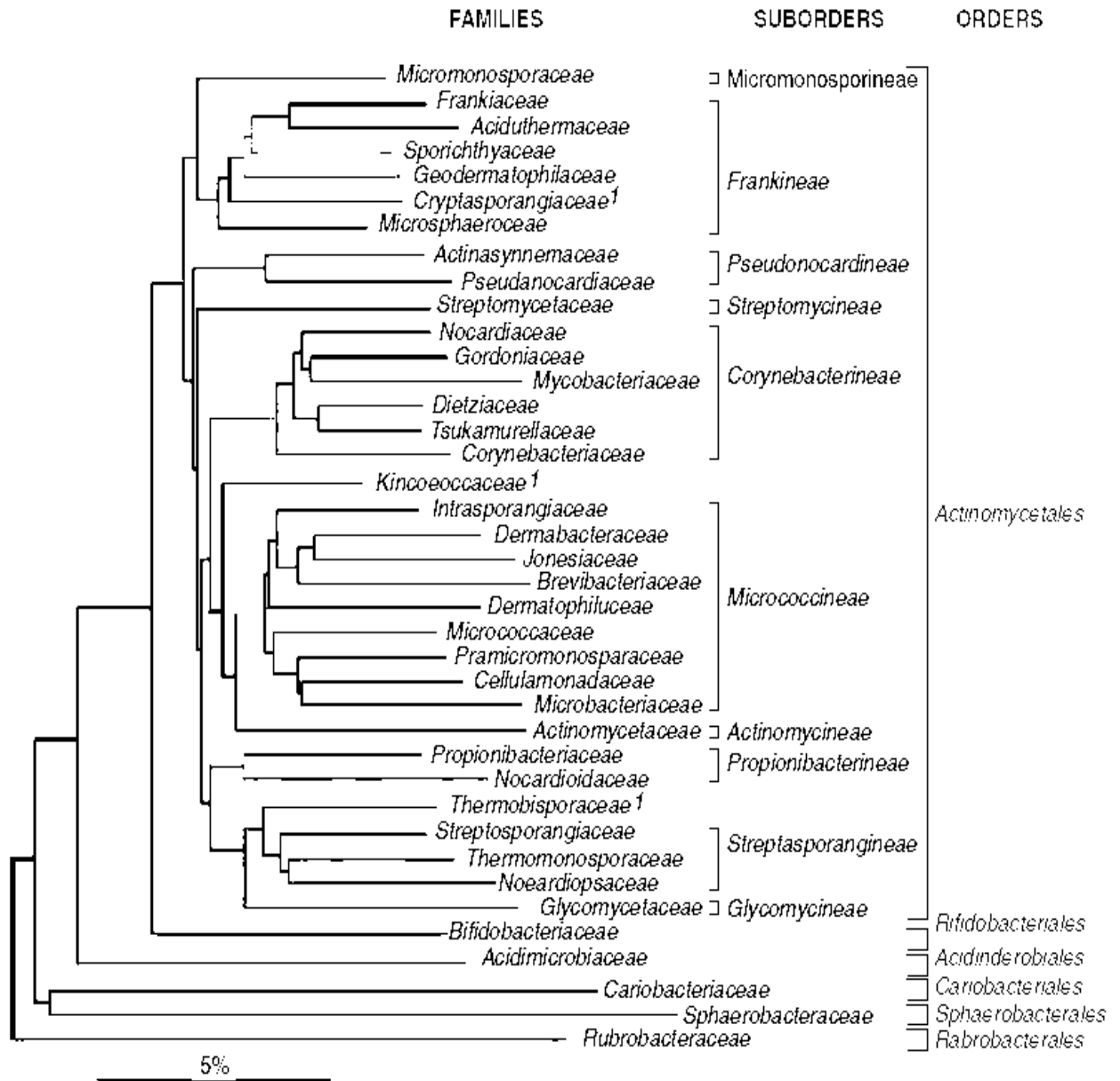
#### **1.5.- Critère moléculaire d'actinomycètes**

Les méthodes d'identification précédentes ont été abandonnées par plusieurs chercheurs pour les remplacer par les techniques moléculaires. Ces approches moléculaires sont souvent utilisées pour leurs rapidité et efficacité (Cook *et al.*, 2003). Parmi les méthodologies employées, la réaction en chaîne de la polymérase (PCR) est largement pratiquée. Le gène ADNr 16S est l'outil principalement utilisé pour l'identification moléculaire des bactéries. Elle consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques, notamment la détermination du pourcentage en GC (supérieur à 50 %) (Prescott *et al.*, 2003), l'hybridation ADN-ADN (Smaoui, 2010), et le séquençage de l'ARN ribosomique 16S (Boughachiche *et al.*, 2012). Ces techniques ont permis de tracer toute la phylogénie des bactéries notamment, celle des actinomycètes.

##### **1.5.1.- Séquençage d'ARN16S**

Cette technique a largement contribué dans la classification et l'identification des bactéries Actinomycetales (Laurent *et al.*, 1999). Grâce au séquençage de l'ARN 16S, certains genres bactériens non mycéliens ont été inclus dans l'ordre des *Actinomycetales*, tandis que d'autres en ont été exclus (Labeda *et al.*, 2012). Le gène ADNr 16S qui code pour l'ARNr 16S (ARN ribosomiaux 16S) est l'un des gènes les mieux conservés parmi les organismes procaryotes (Eubactéries et Archaea). Il a été choisi comme marqueur phylogénétique en constituant une base de comparaison efficace et fiable pour pouvoir à la fois comparer et différencier les bactéries entre elles (Stackebrandt *et al.*, 1994), cette séquences est utilisé pour un certain nombre de raisons. Ces

raisons sont notamment: sa présence dans presque toutes les bactéries, souvent existant comme une famille multigénique, ou opérons; la fonction du gène ARNr 16S au cours du temps n'a pas changé, ce qui suggère que des changements de séquences aléatoires sont une mesure plus précise du temps (évolution); et le gène de l'ARNr 16S est d'une taille suffisamment courte (~1500 pb) pour être analysé rapidement (Patel *et al.*, 2001).



**Figure 4.** Classification des actinomycètes basée sur l'analyse des séquences ARN16S (Stackebrandt *et al.*, 2006).



### 1.5.2.- Hybridation ADN-ADN

Les hybridations ADN-ADN se sont révélées essentielles pour la définition d'une espèce bactérienne. Leurs réalisations n'ont été possibles qu'après la découverte par (Marmur *et al.*, 1962) du phénomène de renaturation de l'ADN.

Les hybridations ADN-ADN, utilisées en bactériologie, sont réalisées à partir d'un mélange de deux ADN dénaturés provenant de deux bactéries différentes. En fonction des similitudes de séquence, deux types de duplex hétérologues peuvent se former (Kitouni, 2007).

## 2.- Ecologie d'actinomycètes

Malgré les recherches considérables, l'écologie des actinomycètes n'est pas encore bien comprise. Les actinomycètes sont les habitants communs de sol, Leur production de géosmine et de MIB (2-méthyle isobornéol) contribue significativement à l'odeur caractéristique des sols. Ils sont, souvent, moins reconnus en tant qu'organismes importants du sol comme est le cas des cyanobactéries et des champignons (Zaitlin *et al.*, 2006).

Les actinomycètes ont été également isolés dans de nombreux environnements aquatiques. Ils ont été isolés à partir des eaux de mer et sédiments marins (Ghanen *et al.*, 2000); d'eau douce et dans les marécages salés (Boughachiche *et al.*, 2005)

Les actinomycètes se rencontrent également sur les débris des végétaux qu'on trouve au borde des rivières et des lacs, les champs de riz (Wang *et al.*, 2006) et les cavernes naturelles (Lee, 2006), beaucoup sont capables de sporuler, ce qui leur permet de survivre en conditions défavorables tel que la salinité (Zaitlin *et al.*, 2006). Ces propriétés jouent un rôle principal dans leur distribution dans l'environnement.

**Tableau 2.** Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat (Goodfellow *et al.*, 1983).

| Genre                    | Habitat   |
|--------------------------|---|
| <i>Actinomadura</i>      | Sol   |
| <i>Actinoplana</i>       | Sol, Eau, Litière                                   |
| <i>Frankia</i>           | Nodules des racines                                 |
| <i>Microbiospora</i>     | Sol   |
| <i>Micromonospora</i>    | Sol, Eau  |
| <i>Rhodococcus</i>       | Sol, Eau, Fumier, Litière, Matière en décomposition |
| <i>Saccharomonospora</i> | Sol, Eau, Litière                                   |
| <i>Streptomyces</i>      | Sol et Eau  |
| <i>Streptosporangium</i> | matière en décomposition et en fermentation         |



### **3.- Importance des actinomycètes**

Les actinomycètes sont les plus prolifiques de tous les microorganismes pour la production d'antibiotiques et d'enzymes (Lazzarini *et al.*, 2000). Ainsi, les glucosidases des actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation de la biomasse végétale (amylases, xylanases) et animale (chitinases). De plus, les actinomycètes produisent non seulement des enzymes nécessaires à la formation d'antibiotiques, mais aussi des enzymes inactivant les antibiotiques pour se protéger de leur action toxique. (Anne *et al.*, 2002), Les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes après les antibiotiques. Certaines sont utilisées dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents (protéases) (Thomas, 2008).

#### **3.1.- Importance dans le domaine industriel**

##### **3.1.- Les cellulases**

Les actinomycètes, en particulier les espèces thermophiles et les *Streptomyces*, excrètent des enzymes qui dégradent la cellulose (Mason *et al.*, 2001). D'autres espèces d'actinomycètes produisent des enzymes qui dégradent l'hémicellulose (Rivas *et al.*, 2003).

##### **3.2.- Les ligninases**

Beaucoup d'espèces d'actinomycètes telles que *Streptomyces thermoviolaceus*, *Streptomyces viridosporus*, *Streptomyces fusca* ont une activité lignocellulolytique et sont capables de produire l'hémiperoxydase, enzyme qui dégrade la lignine (Mason *et al.*, 2001).

##### **3.2.- Importance écologique**

Les actinomycètes jouent un rôle prépondérant dans la fertilisation des sols (Mariat *et al.*, 1990), elles ont un effet sur la structure du sol dans la liaison des particules argileuses grâce aux hyphes qui donnent une structure granuleuse viable ; ce qui améliore la production (Haansuu, 2002). Dans la rhizosphère, les actinomycètes appartenant au genre *Frankia* sont extrêmement importants pour de nombreux types de plantes. Cette importance réside dans le fait qu'elles sont capables de former les nodules des racines de ces plantes et de fixer l'azote atmosphérique. Cette association est appelée: association actinorhizienne (Proscott *et al.*, 2007).

##### **3.3.- Importance Agronomie**

Il existe des associations symbiotiques et spécifiques établies entre les couples de bactéries de type rhizobia et des plantes légumineuses et des actinomycètes du genre *Frankia* avec des plantes actinorhiziennes telle *Casuarina* (Felix, 2003).

Ce que l'on trouve dans 1 gramme de sol: 10 000 à 100 millions d'actinomycètes, Il ne faut pas oublier que les antibiotiques ont une application en agriculture à des fins de lutte contre les

maladies des animaux et des plantes et aussi pour stimuler la croissance des animaux domestiques et accroître les rendements zootechniques (Tomita *et al.*, 1990).

### 3.4.- Autres importances

Les actinomycètes sont utilisés également comme des insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phinotricine) et de substances ayant des activités immunosuppressives et immunostimulantes (la rapamycine et le FK 500) (Petrosyan *et al.*, 2003).

### 4.- Distribution des actinomycètes dans les sols sahariens algériens

Les actinomycètes colonisent une large variété d'habitats naturels (Isabelle *et al.*, 2007). Ils sont capables de se développer sur une large gamme de substrats. Elles sont présentes dans les sols polaires gelés en permanence tout comme les sols désertiques chauds et secs. Dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés. Par contre, il semble d'être absentes dans des eaux minières très acides (pH < 1) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique. Les sols des oasis du Sahara Algérien, bien que soumis à climat aride, se sont révélés riche en actinomycètes parfois réputés rares de par le monde (Boudemagh, 2007).

### 5.- Le Genre *Streptomyces*

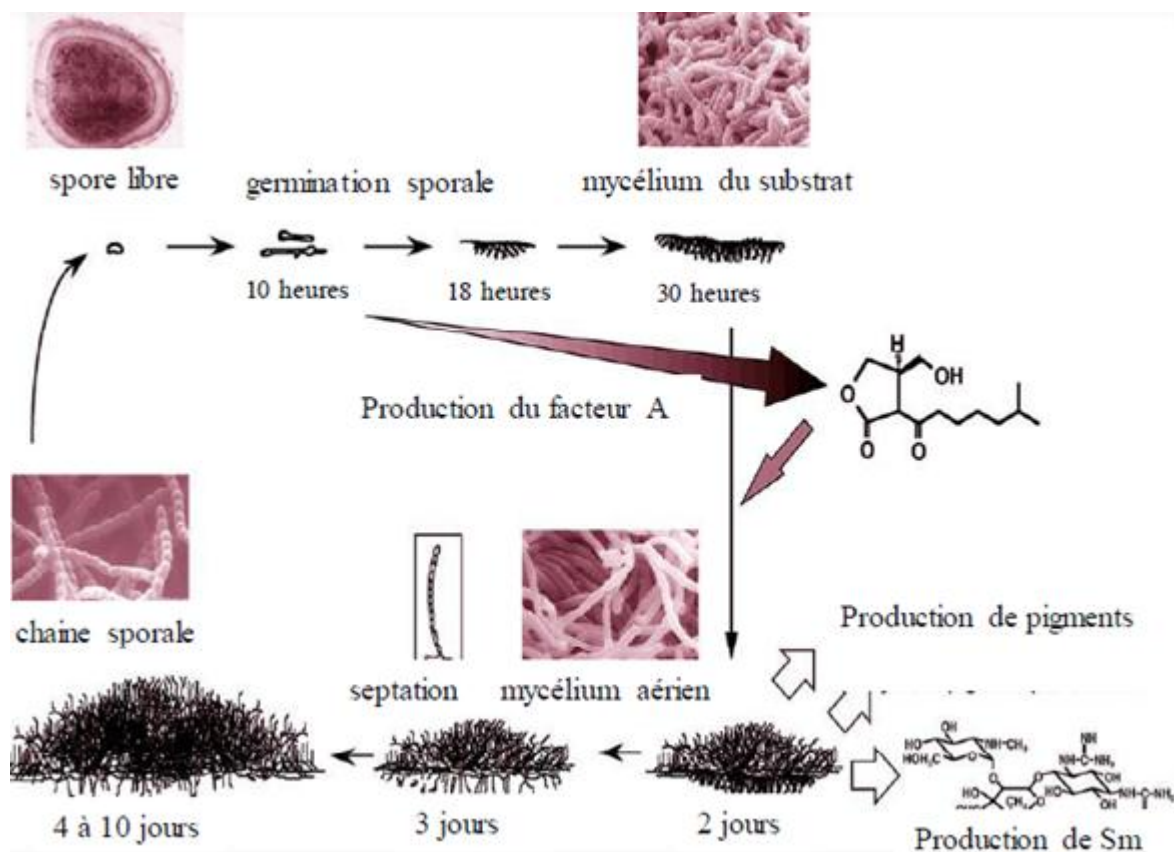
Le genre *Streptomyces* (du grec Streptos: courbé, tordu et Myces: moisissure), le mot *Streptomyces* regroupe tous les membres du genre *Streptomyces* (famille: Streptomycetaceae, ordre :Actinomycetales, classe : Actinobacteria), ces bactéries filamenteuses possèdent un métabolisme complexe et surtout très intense. en effet, depuis 1955 le genre *Streptomyces* est devenu et reste le grand fournisseur de nouveaux antibiotiques (Marinelli, 2009), les *Streptomyces* sont des bactéries gram+ avec une proportion de G+C élevée (69 à 78%) formant des colonies à la morphologie complexe (Hodgson, 2000), colonies micellaires peu étalées, opaques et rugueuses, nombreuses colorations possibles; germes non mobiles, chimio-organotrophes, aérobies à métabolisme respiratoire, catalase +, hydrolysant l'amidon en glucose; formation d'exo spores en chaîne par septation et fragmentation des hyphes (les spores sont assez résistantes à la chaleur sèche, résistantes à la dessiccation mais peu résistantes à la chaleur humide) (Perrin *et al.*, 2012).l'utilisation de bactéries résistantes aux antibiotiques comme germes tests peut conduire à la découverte de molécules efficaces qui peuvent être nouvelles (Rajan *et al.*, 2010).

Cette considérable diversité de composés biologiquement actifs a pour conséquence la grande importance des Streptomycètes dans l'industrie pharmaceutique puisque les molécules produites par fermentation sont la deuxième source de revenus de l'industrie biotechnologique après la brasserie. Les antibiotiques représentent un marché considérable de vingt-huit milliards de \$ au niveau

mondial (Thomson *et al.*, 2004). Les *Streptomyces* produisent un grand nombre de pigments responsables des différentes couleurs du mycélium en plus des pigments diffusibles. Leur température optimale est située entre 25°C et 35°C (à l'exception des espèces thermophiles ou psychrophiles) et leur pH optimum entre 6,5 et 8 (Stackebrandt *et al.*, 2006).

La germination de spores comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour lesquelles le degré hygrométrique joue un rôle important. Parfois, l'activation peut être déclenchée par un choc thermique, par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes* (Miguel *et al.*, 2000).

Le génome des Streptomycètes est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que, plus classiquement, des plasmides circulaires. Une revue sur la génétique des Streptomycètes a été récemment publiée (Hopwood, 1999).

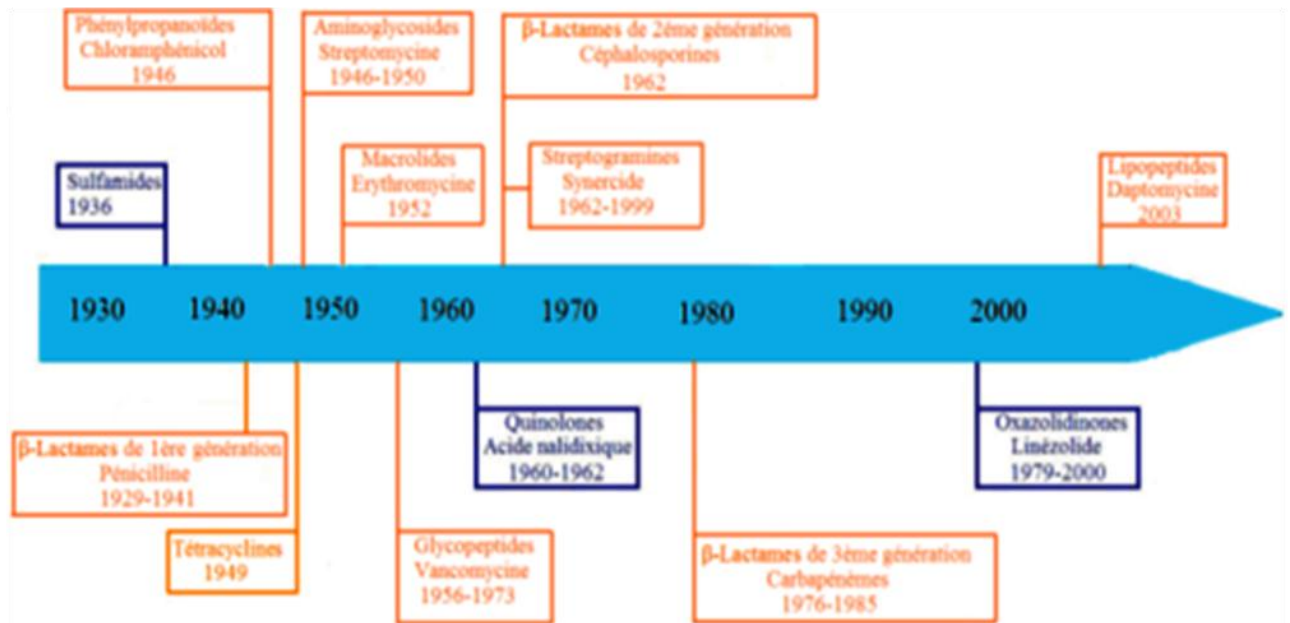


**Figure 5.** Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002).

### III.- Données sur les antibiotiques

#### 1.- Définition

Un antibiotique (du grec anti: « contre », et bios: « la vie ») (Brigitte *et al.*, 2009), les antibiotiques sont des agents antibactériens naturels d'origine biologique; Ils sont élaborés par des microorganismes, champignons (*Penicillium*, *Cephalosporium*) et diverses bactéries (*Actinomycètes*, *Bacillus*, *Pseudomonas*) (Poyart, 2002). La sécrétion de ces molécules favoriseraient la colonisation de leur niche écologique, ou seraient impliqués dans la communication au sein des populations (Fajardo *et al.*, 2008).ils sont des molécules capables d'inhiber la croissance ou même de tuer des bactéries, sans affecter l'hôte (cellules eucaryotes). (Françoise *et al.*, 2008) .



**Figure 6.** Découverte et première utilisation clinique des principaux antibiotiques d'origine naturelle  et d'origine synthétique  (Singh *et al.*, 2006).

#### 2.-Les classifications déférentes des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères :

- leur origine (biosynthétisés par des champignons, des bacilles ou des *Streptomyces*, issus du génie chimique)
- mode d'action
  - modalité d'action
  - leur activité (antibactériens, antifongiques, antimétaboliques).
  - leur composition chimique (dérivés d'acides aminés, hétérosidiques ou polycycliques).

## 2.1.- L'origine

Les antibiotiques sont majoritairement représentés par des molécules d'origine naturelle et leurs dérivés. Ils peuvent aussi être d'origine synthétique ou semi-synthétique (Singh *et al.*, 2006).

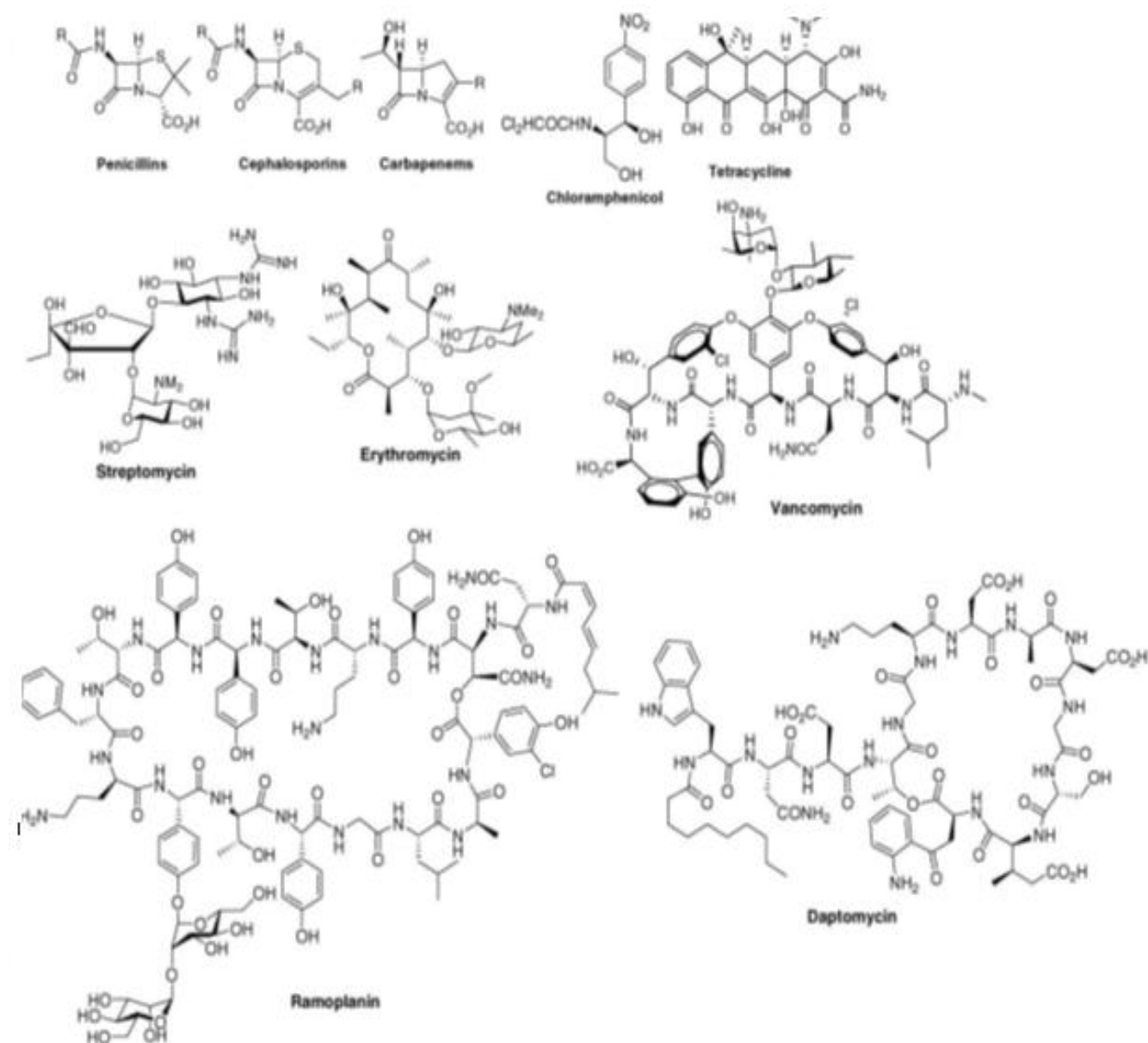
### 2.1.1.- Antibiotiques naturels

Les antibiotiques sont fondamentalement des substances naturelles issues du métabolisme azoté de divers micro-organismes (Guérin *et al.*, 2006).

- soit des champignons: Pénicillines, Griséofulvine, Céphalosporines...

- soit des bactéries: du genre *Streptomyces* et *Bacillus*. Comme antibiotiques dont l'origine est bactérienne on peut citer: Bacitracine, Polmyxine, Mupirocine, Céphamycines, Monobactames...

(Zeghilet, 2009).



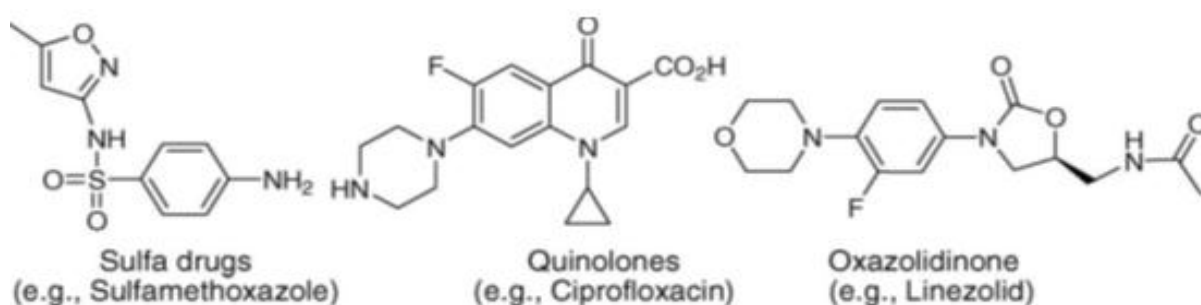
**Figure 7.** Antibiotiques d'origine naturelle (Singh *et al.*, 2006).

### 2.1.2.- Antibiotiques semi-synthétiques

Ces antibiotiques sont obtenus à partir d'une fraction moléculaire naturelle sur laquelle a été greffé un radical chimique (Bouchaa, 2013). Sont des antibiotiques qui agissent sélectivement à faible concentration et en quelques heures sur une étape du métabolisme bactérien. On fait subir certains traitements chimiques simples à des antibiotiques produits par voie fermentaire, notamment des hydrolyses pour séparer la partie fondamentale de la molécule (Zeghilet, 2009)

### 2.1.3.- Antibiotiques de synthèse chimique totale

Il existe seulement trois classes d'antibiotiques synthétiques. La première classe est représentée par les sulfamides, qui sont aussi les premiers antibiotiques à avoir été utilisés cliniquement (Laub, 1986). La seconde classe, les quinolones (ou fluoroquinolones), a été découverte lors de la synthèse de la chloroquine, un antipaludéen, en 1962 (Singh *et al.*, 2006). Les oxazolidinones représentent la troisième classe d'antibiotiques synthétiques. Avec les lipopeptides cycliques (daptomycine), les oxazolidinones constituent l'une des rares classes d'antibiotiques mise sur le marché au cours de ces dix dernières années (Elodie, 2010).



**Figure 8.** Antibiotiques d'origine synthétique (Singh *et al.*, 2006).

## 2.2.- Mode d'action

L'enveloppe bactérienne est une cible majeure de nombreux antibiotiques appartenant aux différentes classes mentionnées dans la figure 9. Certains antibiotiques ciblent directement l'enveloppe en perturbant son intégrité, tandis que d'autres ciblent spécifiquement les mécanismes d'assemblage de la paroi, la membrane cytoplasmique, la synthèse des protéines ou la synthèse des acides nucléiques (Stéphanie *et al.*, 2011).

### 2.2.1.- Effet sur la paroi bactérienne

En inhibant la dernière étape de la biosynthèse du peptidoglycane (muréine composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra cytoplasmique) au cours de la multiplication cellulaire, la nouvelle bactérie n'est plus protégée entraînant ainsi une lyse bactérienne (Zeghil *et al.*, 2009).



Exemple:  $\beta$ -Lactamines (Pénicillines, Céphalosporines, Carbapénèmes, Monobactam).

Mode d'action: Fixation aux PLP « Protéines Liant la Pénicilline », enzymes (transpeptidase) de la membrane cytoplasmique impliquées dans la phase terminale de l'assemblage du peptidoglycane (Lavigne *et al.*, 2007).

### 2.2.3.- Effet sur la membrane cellulaire

Nous citons comme exemple la Polymyxine, son mode d'action est la destruction de la membrane comme un détergent Bactéricide (Lavigne, 2007), elle pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insère parmi les phospholipides de la paroi, perturbant ainsi la perméabilité membranaire (Odile, 2004).

### 2.2.4.- Effet sur les ribosomes

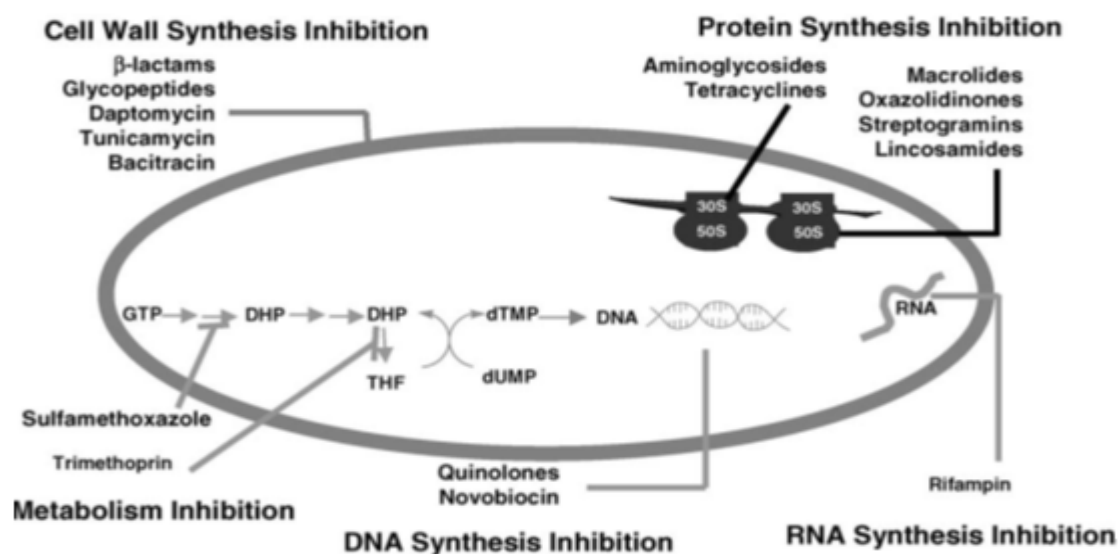
Les inhibiteurs se fixant sur la sous-unité 50S trois familles d'antibiotiques agissent sur la sous-unité 50S du ribosome bactérien et n'ont pas d'effet sur les ribosomes 80S des cellules eucaryotes. Ce sont les antibiotiques de type « phénicole », « macrolide » et « polypeptide » (Odile, 2004).

### 2.2.5.- Effet sur l'ADN

Les antibiotiques de la famille des rifamycines par exemple bloquent la transcription de l'ADN bactérien en se fixant sur l'ARN polymérase bactérienne (Walsh, 2003).

### 2.2.6.-Autres

En agissant en tant qu'anti métabolites bactériens (c'est à dire au niveau des étapes du métabolisme intermédiaire des bactéries).



**Figure 9.** Principaux sites d'action des antibiotiques (Singh *et al.*, 2006).



### 3.- Modalité d'action

Il y a deux notions: un antibiotique peut arrêter la croissance de la bactérie (bacteriostatique, concerne tous les antibiotiques), et/ou tuer la bactérie (bactéricide) (Bebear, 2011).

### 4.- Spectre d'activité

C'est la liste des espèces bactériennes sur lesquelles un antibiotique est susceptible d'agir. Il peut être large (activité de l'antibiotique sur la majorité des espèces gram + et gram -) (Bebear, 2011).

ou spectre limité (actif sur les bactéries Gram positif et quelques Gram négatif, ou spectre étroit (actif uniquement sur certains germes Gram positif ou sur certains Gram négatif)

Il dépend de deux paramètres: les résistances naturelles des espèces bactériennes, et les résistances acquises des souches, qui limitent le spectre initial de l'antibiotique (Bouchaala, 2013).

**Tableau 3.** Le spectre d'activité de quelques antibiotiques (Bebear, 2011).

| famille             | Antibiotique      | Gram+ | Gram- |
|---------------------|-------------------|-------|-------|
| B-lactamines        | Benzylpénicilline | +     | -     |
|                     | Oxacilline        | +     | -     |
|                     | Ampicilline       | +     | +     |
|                     | Imipicilline      | +     | +     |
| Aminosides          | Gentamicine       | +     | +     |
|                     | Tobramycine       | +     | +     |
| Phénicolés          | Chloramphénicol   | +     | +     |
| Tétracyclines       | Doxyeycline       | +     | +     |
| Macrolides          | Erythromycine     | +     | -     |
| Glycopeptides       | Vancomycine       | +     | -     |
| Quinolones<br>autre | acide nalidixique | -     | +     |
|                     | acide fusidique   | +     | -     |

## 5.- La nature chimique

Dans la classification par nature chimique on a une structure de base, comme par exemple la famille des  $\beta$ -lactamines dont la structure de base est le cycle  $\beta$ -lactame, sur lequel s'ajoutent des substituants qui vont faire varier les molécules ( Bebear, 2011).

Autres exemples :

- Les aminosides : des sucres aminés.
- Les macrolides : ce sont de grosses molécules avec plusieurs atomes de carbone (elles sont classées selon le nombre d'atomes de carbone).
- La famille des tétracyclines : ce sont des molécules qui possèdent 4 cycles (Odile, 2004).

## *PARTIE II*

# **MATERIEL ET METHODES**

## II- Matériel et méthodes :

### A- Matériel :

#### 1.- Appareillage

Il s'agit du matériel courant du laboratoire notamment:

Agitateur magnétique chauffant, autoclave, balance électronique (KERN ABj), étuve 30C° type memmert, pH mètre (HANNA instrument), Réfrigérateur 4°C, un appareil photo numérique «SAMSUNG» de résolution de 12,2 Méga pixel (Zoom optique x5).

#### 2.- Petit matériel

Bec de bunsen, flacons de 250ml, boîtes de pétri, écouvillons, pipettes pasteur, anse de platine, tubes à essai, éprouvettes graduées.

#### 3.- Produits chimiques

Glucose, Extrait de levure, Extrait de malt, Extrait de viande, Peptone de caséine, Agaragar, eau physiologique, NaOH (0,1N), HCl (0,1N)

#### 4.- Les isolats d'actinomycètes :

Les souches d'actinomycètes utilisées dans notre travail sont dénommées G61 et B31. Elles proviennent du laboratoire de biologie des systèmes microbiens (LBSM) de l'école normale supérieure (ENS) de Kouba. Elles ont été isolées par Belghit (2010). La souche G61 à partir d'un sol reg de Metlili (Wilaya de Ghardaia), elle a une bonne croissance sur les milieux de culture :ISP2, ISP3, ISP4, GN et Bennett et une morphologie typique de *Streptomyces* type S (spirale), elle possède un mycélium desubstrat non fragmenté et un mycélium aérien contenant des chaînes spirales de 2 à 6 chaînes de spores. La souche B31a été isolée à partir d'un sol provenant de la région de Djelfa. Cette souche est caractérisée par une bonne croissance sur plusieurs milieux de culture à savoir: ISP2, ISP3, ISP4, SSB, GYEA et Bennett, elle a une morphologie typique des *Streptomyces* de type S (spirale), elle possède un mycélium desubstrat non fragmenté et un mycélium aérien contenant des chaînes spirales (6 à 8 tours) de 10 à 50 spores.

Ces souches ont été isolées sur milieu « chitine-vitamines B » de Hayakawa et Nonomura (1987) additionné d'antibiotiques sélectifs suivants: pénicilline (25 mg/l), kanamycine (25 mg/l), chloramphénicol (25mg/l), rifamycine (10mg/l), streptomycine (10mg /l) (Boudjella, 1994). Un antifongique, l'actidione (50mg/l) est ajouté afin d'inhiber tout développement fongique. La méthode d'ensemencement utilisée est celle des suspensions dilutions (Rapilly, 1968). Les boîtes ensemencées sont incubées à 30°C durant 3 semaines. La reconnaissance des genres est effectuée par observation au microscope photonique (Zeiss) aux grossissements 100 et 400. Les études

morphologique, physiologique et chimiotaxonomique ont montré l'appartenance des deux souches au genre *Streptomyces*.

### 5.- Les germes cibles.

Deux germes tests sont utilisés juste pour montrer l'activité des souches d'actinomycètes dans les différents milieux de culture utilisés. Ces deux germes proviennent de la collection du laboratoire de microbiologie (LBSM) de l'E.N.S de kouba-Alger. Une souche levurienne de *Candida albicans*(IPA200) d'origine institut Pasteur d'Alger et une souche bactérienne *Bacillus subtilis* sous code de référence (ATCC 6633) (American Type Culture Collection).

### 6.- Les milieux testés :

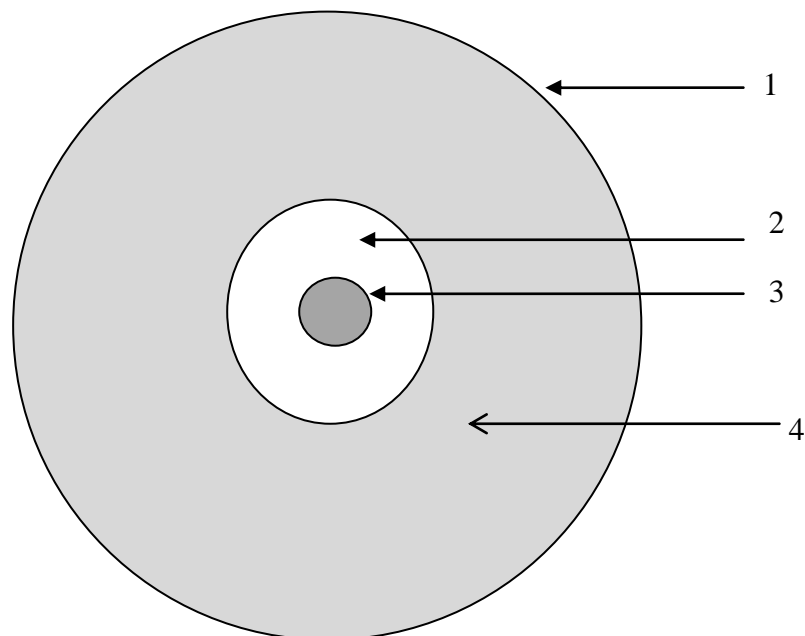
La mise en évidence des activités antimicrobiennes a été menée sur 10 milieux contenant diverses sources de carbone, d'azote, d'énergie et de sels minéraux. Ils sont à base d'extrait de levure, d'extrait de malt, d'extrait de viande, de peptone de caséine et de glucose. La composition de ces milieux est présentée au tableau 4. Le pH a été ajusté à 7,2 (avec NaOH 0,1 N et HCl 0,1 N).

**Tableau 4.** Les milieux de culture solides utilisés.

| N°  | Composition pour un litre  | Remarques          |
|-----|--|--------------------|
| MA0 | Glucose (G) = 4g; extrait de malt (EM) = 10g ; extrait levure (EL) = 4g. | <b>ISP2 (P2)</b>   |
| MA1 | EM = 10g; EL = 4g.   | P2 sans G          |
| MA2 | G= 4g; EL= 4g.   | P2 sans EM         |
| MA3 | G= 4g; EM = 10g.   | P2 sans EL         |
| MB0 | G= 10g; peptone (P) = 2g; EL= 1g; extrait viande (EV)=1g.                | <b>Bennett (B)</b> |
| MB1 | G= 10g ; P = 2g ; EL= 1g.  | B sans EV          |
| MB2 | G= 10g ; P = 2g ; EV= 1g.  | B sans EL          |
| MB3 | P= 4g ; EL= 1g; EV= 1g.  | B sans G           |
| MB4 | G= 10g; EL= 1g; EV= 1g.  | B sans P           |
| MB5 | G= 10g ; P = 2g.   | B sans EL et EV.   |

**B- Méthodes :****Production d'antibiotiques sur milieux solides:**

Les expériences sont menées sur milieux solides. Les activités antagonistes sont mises en évidence par la technique de double couche. L'actinomycète est ensemencé en touche à l'intérieur d'un cercle de 10 mm de diamètre, au centre de la boîte de Pétri contenant l'un des milieux gélosés mentionnés ci-dessus. Après 8 à 15 jours d'incubation à 30°C (selon les souches), les cultures (3 boîtes pour chaque milieu et chaque souche test) sont inondées par 3 mL de milieu ISP2 semisolide (10 g/L d'agar) préalablement ensemencé avec le germe cible (une levure : *Candida albicans* ou une bactérie : *Bacillus subtilis*). Les boîtes sont mises au réfrigérateur (4°C pendant 2 h) afin de laisser les antibiotiques diffuser dans la gélose tout en inhibant momentanément la croissance des germes cibles. Elles sont ensuite réincubées à 30°C et la taille des zones d'inhibition est mesurée en mm (y compris le diamètre de l'isolat) après 24 h pour la bactérie et 48 h pour la levure.



**Figure 13.** Méthode de double couche

**Note:**

- 1: Boîte de Pétri
- 2: Zone d'inhibition
- 3: Colonie d'actinomycète de 10 mm de diamètre
- 4: Germe test

***PARTIE III***

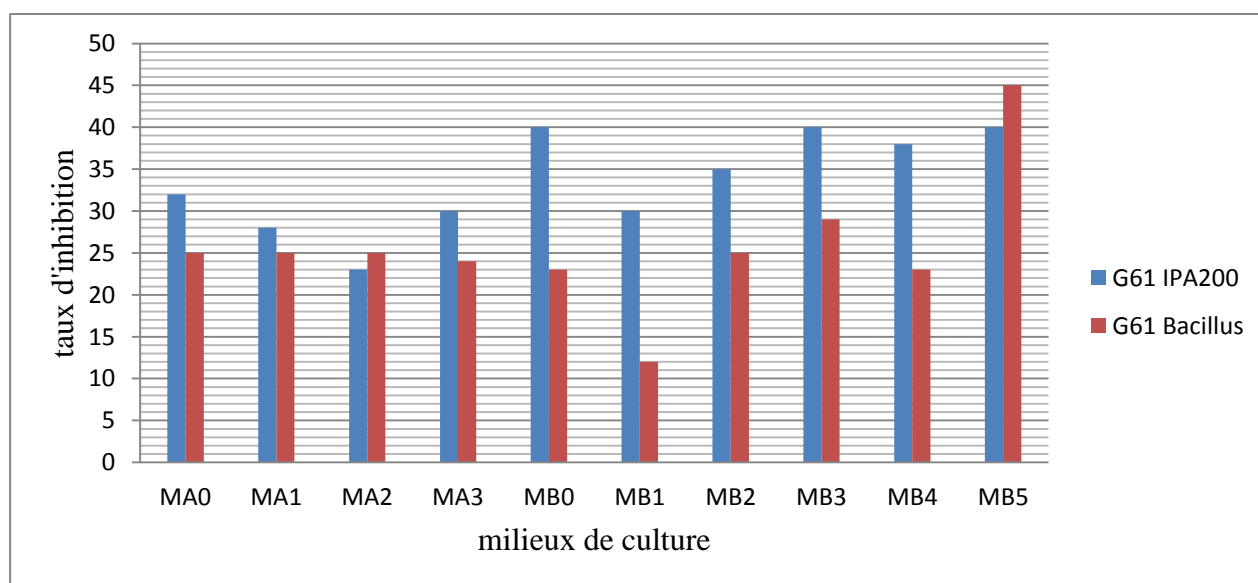
**RESULTATS ET DISCUSSION**



## Résultats

L'activité des antibiotiques a été mise en évidence par la technique de double couche. Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible. Cette technique nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes G61 et B31 envers les bactéries tests utilisées : *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*, sur les différents milieux de culture choisis.

L'histogramme suivant représente le taux d'inhibition de la souche G61 contre les deux germes tests choisis.

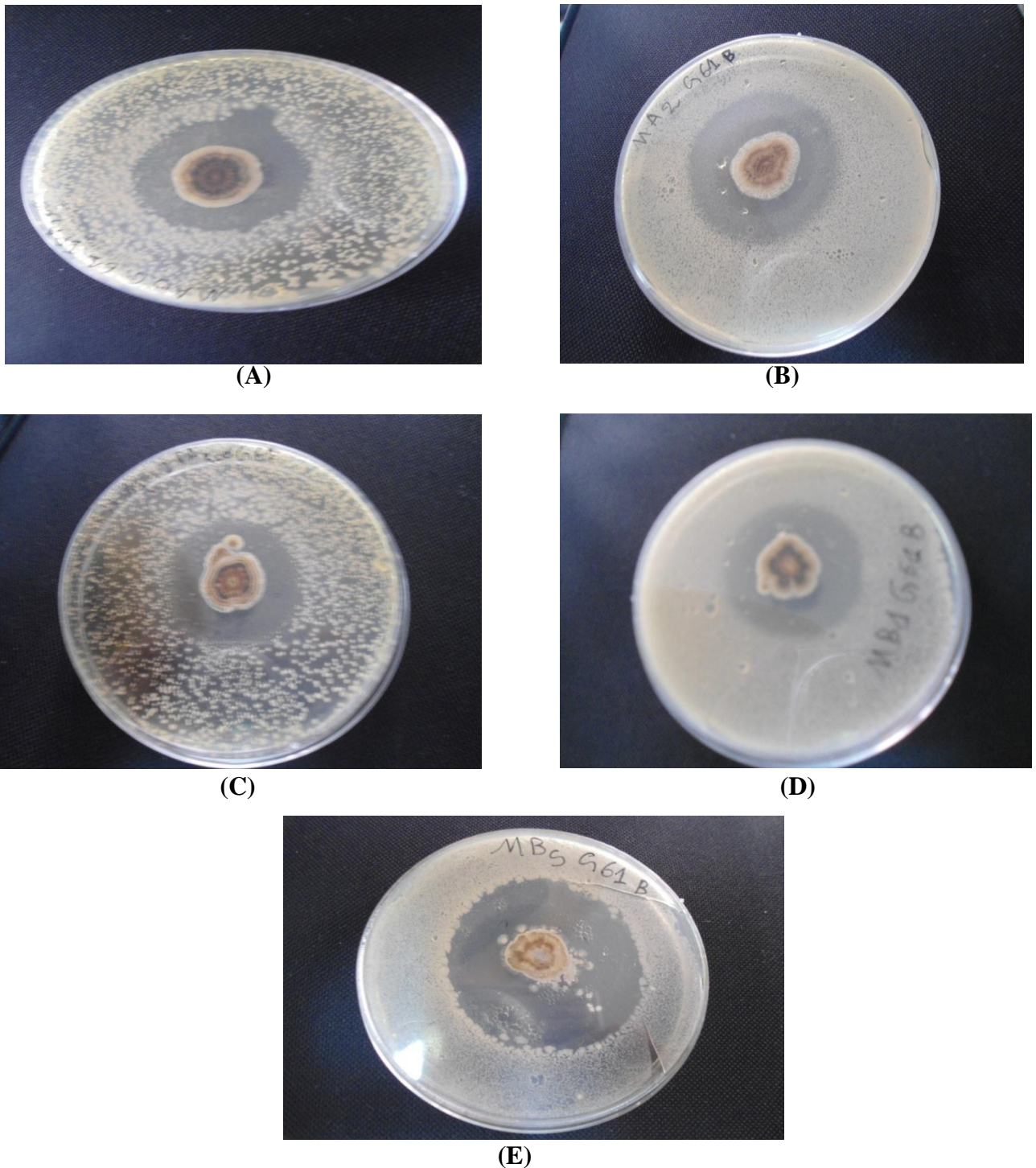


**Figure 11.** Activité de la souche G61 contre les deux souches tests dans les dix milieux de culture choisis.

**Note :** le diamètre d'inhibition compte celui de la colonie (10mm)

D'après l'histogramme les diamètres des zones d'inhibition diffèrent d'un milieu de culture à l'autre ainsi d'un germe-test à l'autre. La souche G61 présente une activité antibactérienne et antilevurienne sur tous les milieux de culture. Elle a montré une activité dans les milieux MA1, MA2 et MA3 qui ressemble plus au moins à celle obtenue avec le milieu standardisé MA0 (ISP2). De même elle a présenté un taux d'inhibition (entre 30 et 40 mm) dans les milieux MB1, MB2, MB3, MB4 et MB5 contre *Candida albicans*. En général ce taux d'inhibition est similaire à celui obtenu avec le milieu de culture MB0. Par contre il existe un désaccord entre l'activité obtenue contre *Bacillus subtilis* dans les milieux MB1, MB2, MB3, MB4 et MB5 si on la compare avec celle obtenue dans le milieu standard MB0. En effet on remarque une faible activité

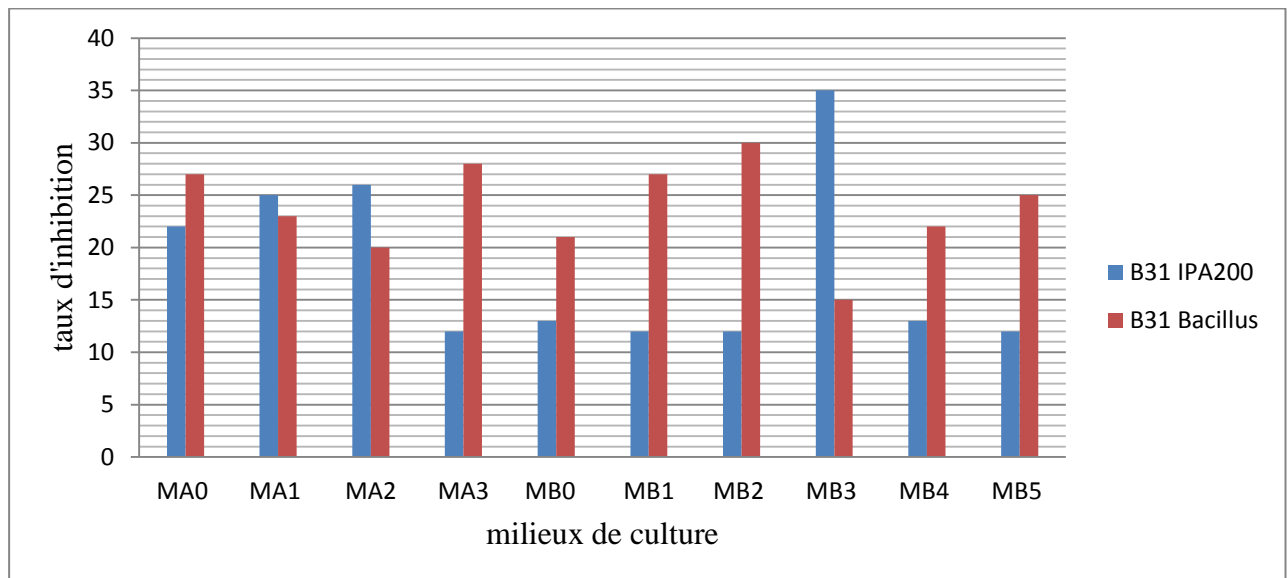
dans le milieu MB1, moyenne dans les milieux MB2, MB3 et MB4 et plus importante dans le milieu MB5.



**Figure 12.** Photographies d'activité de la souche G61 contre les deux souches tests *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* sur quelques milieux de culture

**Note :** (A) G61 contre *C.a* (IPA200) au le milieu MA0 ; (B) G61 contre *B.s* (ATCC 6633) au milieu MA2 ; (C) G61 contre *C.a* (IPA200) au milieu MA2 ; (D) G61 contre *B.s* (ATCC 6633) au milieu MB1 ; (E) G61 contre *B.s* (ATCC 6633) au milieu MB5.

L'histogramme suivant représente le taux d'inhibition de la souche B31 contre les deux germes tests choisis.



**Figure 13.** Activité de la souche B31 contre les deux souches tests dans les dix milieux de culture choisis.

**Note :** le diamètre d'inhibition compte celui de la colonie (10mm)

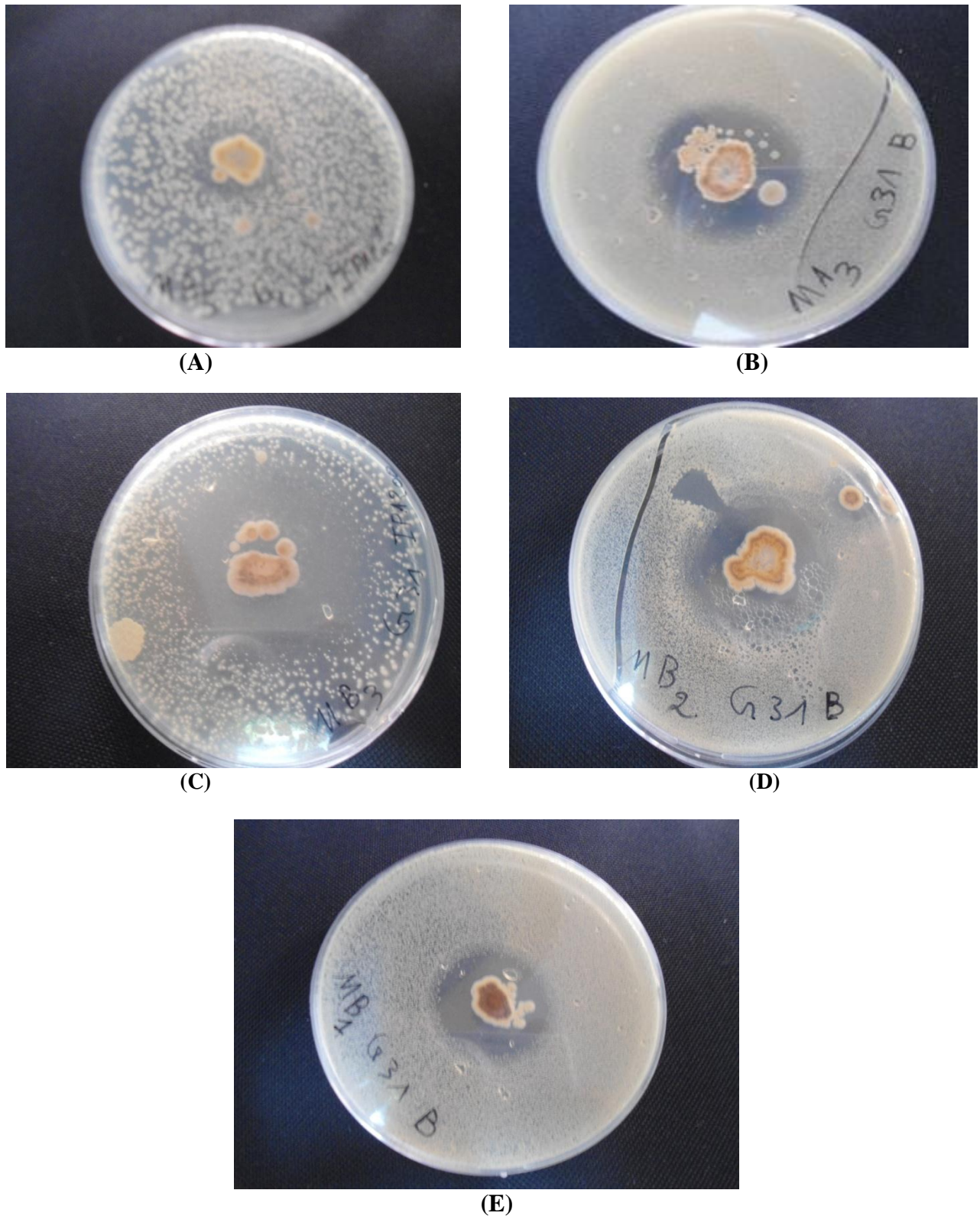
Les résultats présentés dans cet histogramme montrent que les activités de la souche B31 sont différentes de même comme on a vu avec la souche G61.

La souche B31, présente une activité antibactérienne et antilevurienne dans les milieux MA1 et MA2 presque similaire avec celle obtenue dans le milieu standardisé MA0 (ISP2), à l'exception du milieu MA3 qui a montré un taux d'inhibition élevé contre *Bacillus subtilis* et autre faible contre *Candida albicans*.

Concernant l'activité de cette souche dans les milieux de la série MB, nous constatons un taux d'inhibition antilevurien faible (12, 13mm) dans tous les milieux à l'exception de MB3 qui a marqué une zone d'activité antilevurienne forte (35mm)

Dans le cas de l'activité antibactérienne cette souche a présenté des activités moyennes à fortes (20 à 30 mm) dans tous les milieux sauf le milieu MB3 qui a montré une faible activité (15mm)





**Figure 14.** Photographies d'activité de la souche B31 contre les deux souches tests *Candida albicans* et *Bacillus subtilis* sur quelques milieux de culture

**Note :** (A) B31 contre *C.a* (IPA200) au le milieu MB5 ; (B) B31 contre *B.s* (ATCC 6633) au milieu MA3 ; (C) G61 contre *C.a* (IPA200) au milieu MB3 ; (D) B31 contre *B.s* (ATCC 6633) au milieu MB2 ; (E) B31 contre *B.s* (ATCC 6633) au milieu MB1.

## Discussion

Les activités des deux isolats G61 et B31 ont été mises en évidence par la technique de la double couche en utilisant deux milieux de culture complexes standardisés ISP2 et Bennet, et huit autres dérivés de ces deux milieux. Il faut rappeler que les deux souches d'actinomycète ont été isolées à partir des échantillons de sols sahariens algériens au sein du laboratoire de biologie des systèmes microbiens (LBSM) par (Belghit, 2010), et ont été choisies selon leur activité antagoniste contre les bactéries et les levures. D'autres travaux morphologiques, physiologiques, chimiques et moléculaires effectués par le même auteur ont confirmé l'appartenance de ces deux isolats au genre *Streptomyces*. Ce genre bactérien est le plus diversifié des actinomycètes avec 630 espèces d'après (Euzéby, 2013).

Nous avons choisi les deux milieux de cultures standardisés selon les résultats des travaux obtenus par (Badji, 2006) au sein du même laboratoire (LBSM). Cet auteur a testé 10 milieux de culture les plus utilisés pour la production d'antibiotiques par les actinomycètes à savoir l'ISP2 (à base d'extraits de malt et de levure et de glucose), l'ISP3 (à base de farine d'avoine et de sels minéraux), l'ISP4 (à base d'amidon et de sels minéraux), l'ISP5 (à base de glycérol et d'asparagine), le Bennett (à base de glucose, de peptone de caséine, d'extraits de viande et de levure), le GYEA (à base d'extrait de levure et de glucose), le MCB (à base d'extrait de levure, de dextrine et de sels minéraux), l'AAS (à base d'amidon et d'asparagine), l'ACA (à base d'amidon et de caséine) et le FSO (à base de farine de soja et de sels minéraux). Il a conclu que l'ISP2 et le Bennett sont les meilleurs. Ces deux milieux de culture contiennent des sources de carbone (destinés à produire les composés structuraux) et des source d'azote (destinés à produire les constituants essentiels comme les acides aminés (protéine), les nucléotides, les phospholipides et d'autres constituants cellulaires), des source minérales et souvent certains facteurs de croissance (vitamines, acides aminés, bases azotées) (Guezlane *et al.*, 2010).

Dans notre étude nous avons essayé de prendre ces deux milieux de culture et d'enlever de chacun d'eux un ou deux constituants de sa composition en formant: 3 milieux dérivés de l'ISP2, à savoir MA1 (ISP2 sans glucose), MA2 (ISP2 sans extrait malt), MA3 (ISP2 sans extrait levure). Et 5 dérivés de Bennett, à savoir : MB1 (Bennet sans extrait viande), MB2 (Bennet sans extrait levure), MB3 (Bennet sans glucose), MB4 (Bennet sans peptone) et MB5 (Bennet sans extrait levure et extrait viande). La suite de travail comprend la comparaison des résultats d'activité obtenus de chaque milieu standardisé avec ses milieux dérivés.

Après la mise en évidence des activités antimicrobiennes qui ont été menées sur les 10 milieux de culture quels soient dérivés ou standardisés, nous avons remarqué la présence de l'activité des souches d'actinomycètes dans tous ces milieux. Cependant si nous comparons le taux d'inhibition de milieu standardisé MA0 (ISP2) et ses milieux dérivés, pour les deux souches G61 et B31, nous pouvons noter qu'il n'y a pas une grande différence. Contrairement, au milieu standardisé MB0 (Bennett), ou nous pouvons voir une différence importante entre ce milieu et ses dérivés pour les deux souches d'actinomycètes. En effet, la souche G61 a montré une grande activité dans le milieu MB5 et spécifiquement contre le germe test *Bacillus subtilis*. Pourtant, la souche B31 a révélé une grande activité spécifiquement contre *Candida albicans* dans le milieu MB3, et contre *Bacillus subtilis* dans les milieux MB1 et MB2. Ce, nous amène à penser que la production des molécules actives de la souche G61 est favorisée dans le milieu MB5. Tandis que la production des antibiotiques de la souche B31 est favorisée dans les milieux MB1, MB2 et MB3. Il faut rappeler que tous ces milieux dérivés sont caractérisés par l'absence d'un ou deux ingrédients de leurs compositions, ce qui diminue certaines sources nutritionnelles.

Selon Martin et Demain (1980), les sources nutritionnelles ont un effet sur la production des métabolites secondaires, Parmi ces sources, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectant fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotiques en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments. Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les *Streptomyces*.

D'après Aharonowitz et Demain (1978); Omura et Tanaka (1986); Cheng *et al* (1995); Sanchez et Demain (2002), La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs entre autres chez les actinomycètes. Cette production est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la synthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. Le niveau de production des métabolites secondaires, notamment chez les actinomycètes, dépend à la fois de la quantité de précurseurs disponibles et du niveau d'activité des enzymes de la voie de biosynthèse. Ces deux leviers de régulation du métabolisme secondaire sont influencés par

de nombreux paramètres, entre autres nutritionnelles et physico-chimiques et sont contrôlés par des mécanismes de régulation particuliers (Strub, 2008).



# **CONCLUSION GENERALE**

## Conclusion générale

L'étude que nous avons entreprise a pour objectif de rechercher des milieux de culture solides favorables à la production des antibiotiques par des souches d'actinomycètes isolées des sols sahariens algériens.

Deux milieux de culture solides standardisés ISP2 et Bennett ont été choisis, sur la base d'un travail déjà effectué, qui a montré leur capacité de favoriser la croissance des actinomycètes. En enlevant un ingrédient ou plus, de leur composition, huit autres milieux de culture solides sont dérivés et ont été choisis. La méthode utilisée pour montrer le meilleur milieu favorisé à la production des antibiotiques est celle de la double couche. Le diamètre d'inhibition est mesuré par millimètre tout autour de la colonie d'actinomycète ensemencée en touche à l'intérieur d'un cercle de 10 mm de diamètre, au centre de la boîte de Pétri contenant l'un des dix milieux de culture gélosés. Les expériences ont été menées sur des milieux solides contenant à la fois la souche d'actinomycète et le germe test. Deux isolats d'actinomycètes ont été exploités G61 et B31 contre deux souches tests: *Candida albicans* et *Bacillus subtilis*.

Nous avons constaté d'une manière générale que les milieux qui ont favorisé la croissance des souches ont favorisé la production d'antibiotique et vice versa. Nous n'avons pas trouvé une différence remarquable entre les activités obtenues avec le milieu standardisé ISP2 et ses milieux dérivés dans les deux cas d'actinomycètes G61 ou B31. Par contre nous avons vu la production des molécules bioactives de la souche G61 est favorisée dans le milieu MB5 spécifiquement contre la souche test *Bacillus subtilis*. Alors que, la souche B31 a révélé une bonne activité contre *Candida albicans* dans le milieu MB3 et contre *Bacillus subtilis* dans les milieux MB1 et MB2. La production d'antibiotiques sur ces milieux que nous avons testés est nettement meilleure que celle sur les milieux couramment utilisés (ISP2 et Bennett). Il faut rappeler que ces derniers sont des milieux d'étude des caractéristiques culturelles des actinomycètes et non des milieux de production d'antibiotiques. Ceux-ci doivent être recherchés en testant plusieurs sources de carbone, d'azote et de sels minéraux.

Cette étude préliminaire qui vient d'être réalisée ouvre plusieurs perspectives qui peuvent être résumées comme suit :

- Optimiser la production d'antibiotiques sur les milieux solides qui ont donné de bons résultats en jouant sur les concentrations des sources carbonées, et/ou azotées ou en ajoutant des facteurs de croissances.
- Rechercher la production d'antibiotiques sur milieux liquides et déterminer les meilleurs favorisants.

- Optimiser la production d'antibiotiques sur milieux liquides en modifiant les paramètres des conditions de culture.
- Tester d'autres milieux synthétiques et semi synthétiques et rechercher les meilleurs.

**REFERENCES**  
**BIBLIOGRAPHIQUES**

**Référence bibliographique :**

- 1) **AnneD, Lynda H, Claire A., 2002.**-L'évaluation des risques liés aux bio-aérosols générés par le compostage des déchets outeare .)page 22.
- 2) **Aminetou B M .,Aicha MintS B.,2008.**- Manuel de travaux pratiques de microbiologie bg2.page 9
- 3) **Anne-C C,2009,** synthèse enzymatique de nouveaux dérivésdithiopyrrolones par saccharothrixalgeriensis.page J26
- 4) **Aharonowitz Y., Demain A.L. 1978.** Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomycesclavuligerus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 14: 159-164.
- 5) **BrigitteB .; Martine C .;Annie M.,Virginie Romoli .;2009.**-livre microbiologie (les savoirs en situation) ,page :28
- 6) **Boughachiche F.,Reghioua S., Ouilmi L ., Zerizers H ., Kitouni M ., Boudemagh A Andboulahrouf A ., (2005).**-Isolement d'actinomycétale productrices de substance. PP.5-10.
- 7) **Boughachiche F., 2012.**-Étude de molécules antibiotiques secrétées par des souches appartenant au genre *Streptomyces*, isolées de Sebkh," Thèse *de doctorat, Université Mentouri- Constantine., Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, Algérie, 164p.*
- 8) **Boudmagh A., 2007.**-Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **62-128p.**
- 9) **Bebear, 2011.**-De l'agent infectieux à l'hôte – Bactériologie (Les antibiotiques : structure, mode d'action, mécanismes de résistance.) page 2
- 10) **Belghit., (2010).**- Recherche dans les sols sahariens algeriens d'actinomycètes producteurs de molécules actives contre *Candida albicans*. Mémoire de magister. ENS- kouba
- 11) **Bouchaala O., 2013.**- Thèse , Synthèse caractérisation et activité biologique d'une base de schiff ,Page 4.
- 12) **BadjiB., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. 2005.** Activitéantifongique d'une souche d'Actinomadura d'origine saharien sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*. 15 : 211–219.
- 13) **Bahlaoui, 2006** -DESA Microbiologie& Bio-ingénierie .Page46
- 14) **Bacilio, M. Aguilar-Flores, S., Ventura-Zapata, E., Perez-Campos, E., Bouquelet, S. and Zenteno, E. 2003.**Chemicalcharacterization of radical exudatesfromrice (*Oryzasativa*) and their effect on the chemotacticcapacity of endophyticbacteria and tworoot and soil plant growth-promotingbacteria (*Azospirillum* and *Bacillus* spp.). *Plant and Soil* 249: 271-277 -

- 15) Cook A., Paul R., Meyers P. R., 2003.-Rapid identification of filamentous actinomycetes to the genus level using genus-specific 16S rRNA gene restriction fragment patterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 53: 1907-1915.)
- 16) Cheng Y.R., Frang A., et Demain A.L., (1995).-Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis by *Streptomyces hygroscopicus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **43** (6) : 1096-8.
- 17) Elodie G., 2010.- Molécules antibactériennes issues d'huiles essentielles séparation, identification et mode d'action, page 6.
- 18) Françoise V. B., Pharm P. T., 2008.-Pharmacologie et Pharmacothérapie Anti-infectieuse, 1. Antibiotiques, 2. Antifongiques page : 1
- 19) Felix D. D., (2003).-Defining new roles for plant and rhizobia nodules in sole and mixed plant culture involving symbiotic legumes. *New Phytologist*. 158: 39- 49.
- 20) Fajardo, A. And Martínez, J. L., (2008).-Antibiotics as signals that trigger specific bacterial responses. *Current opinion in microbiology*, **11**(2), 161–167.
- 21) Ghanem N.B., Sabry S. A., El-Sherif Z. M And Abu El-Elal G.A., 2000.- Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **46** : 105 – 111)
- 22) Guezlane T.; Kahlouche B. ; Athmani-Gluemouris S., 2010.-livre de microbiologie travaux pratiques ,page 51-57-58-59- 60-61.
- 23) Guérin, F., Daniellou, F., Duraffourg, J., & Rouilleault, H. (2006).- Comprendre le travail pour le transformer : La pratique de l'ergonomie. Lyon, France: ANACT.
- 24) Horinouchi S., 2002.-Antimicrobial hormone, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontiers in Biosciences*. **7**: 2045-2057.
- 25) Hodgson D.A., 2000.-Primary metabolism and its control in Streptomyces: a most unusual group of bacteria. *Advances in Microbial Physiology*, **42**:47-238).
- 26) Hopwood D.A., 1999.- Forty years of genetic work with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* (review article). *Microbiology*, **145**:2183-2202).
- 27) Haansuu, 2002. -Demethyl (C-11) cezomycin - a novel calcimycin antibiotic from the symbiotic, N<sub>2</sub>-fixing actinomycete *Frankia*. *Academic Dissertation*
- 28) Isabelle B., Michel J., Claire M., 2007.-Technologies De L'eau - alimentation en eau potable - les organismes dans les filières de production d'eau potable. Page 11.
- 29) Junker Kerstin, Laura Schmidt, Gregor Weirich, et al.-Two North American Families with Hereditary Papillary Renal Carcinoma and Identical Novel Mutations in the MET Proto-Oncogene. *Cancer Res* 1998;58:1719-1722.

- 30) **KitouniMohamoud** ,2007 .- Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotique à partir d'écosystèmes extrêmes identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées .page 9-20.
- 31) **Larpent J. P., 2000.**- Introduction à la nouvelle classification bactérienne et les principaux groupes bactériens. Lavoisier. France.4 : 183-212.
- 32) **Lee ,S.D.,2000.**-amycolatopsis jejuensissp . nov .and amycoplatopsishaloteranssp .nov ,novelactinomycetesisolatedfrom a natural cave . int.j.syst .Evolmicrobiol .56 , 549- 553.
- 33) **Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vanncanneyt M., Swings J. Et Al.,2012.**-Phylogenetic study of The specieswithin the family*Streptomyetaceae*,” *Antonie van Leeuwenhoek*, vol. 101, pp. 73-104.
- 34) **Laurent F.J., Provost F., Boiron P., 1999.**,Rapid identification of clinically relevant *Nocardiaspeci*sto genuslevel by 16S rrnagene PCR,” *J. Clin. Microbiol.*, vol. 37, pp. 99-102
- 35)**LamKs.,2006.**-Discovery of novelmetabolitesfrom marine actinomycetes. *CurrOpinMicrobiol.*9:245–251.
- 36) **Lazzarini A, Cavaletti, Toppo G &Marinelli F., 2000.**- Rare genera of actinomycetesaspotentialproducers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek* .78: 399-405.
- 37) **Lavigne .P,Janvier., 2007.**-effets des antibiotiques et mécanismes de résistance. page1-2
- 38) **Laub-Kupersztejn R, Antoine O, Pohl P, Thomas J(1976).**-[Characterization by zymograms of R factor-determinedbeta-lactamases: plasmids of defined and undefined compatibility groups (author'stransl)]. *Ann Microbiol (Paris)*; 1976 Feb-Mar;127A(2):237-46
- 39) **MarmurJ . And Doty P., 1962.**-Determination of the base composition of desoxyribonucleicacidfromits thermal denaturationtemperature .j.mol .biol.5 , 109-118 .
- 40) **Mason M. G., Ishizawa K., Silkstone G., Nicholls P. Et Wilson M. T., 2001.**- Extracellularhemeperoxidases in Actinomycetes : A case of Mistakenidentity. *Appl. Envirnm. Microbiol.* 67(10), 4512-4519.
- 41) **MariatF . Et Sebald M ., 1990.**- les actinomycètes dans : bactériologié médicale . le minor .edition médecine – science .flammarion .France .
- 42) **Migulez E.M., Hardisson C. Et Manzanal M.B.,2000.**-Streptomyete : a new model to studycelldeath. *Inter Microbiol.* 3: 153-158.)
- 43) **MincerTj, Jensen Pr, Kauffman Ca, Fenical W., 2002.**-Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in oceansediments. *Appl Environ Microbiol.Tropical Journal of Pharmaceutical Research.* 9: 373-377.
- 44) **Marinelli F ., 2009.**-Antibiotic and streptomyces : the futur and antibioticdiscovery . microbiologytoday .2 :20-23

- 45) Marwick, J.D., Wright, P.C., Burgess, J.G. (1999).- Bioprocess intensification of production of novel marine bacterial antibiotic through bioreactor operation and design. *Mar. Biotechnol.* , 1, 495-507.
- 46) Martín J.F., Demain A.L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiology Reviews*. 44: 230-251.
- 47) Marchandin, Hélène ; Boumzebra A ; Jean-Pierre H ; Campos J ; Godreuil S ; Boulier A. (2007).- Dépistage des entérocoques résistants aux glycopeptides : six ans d'étude dans trois services de réanimation au CHU de Montpellier. *Pathologie-biologie*. 55(8-9) : 418-423
- 48) Nelson K . E ., Clayton R .A ., Gill S . R ., Gwinn M . L ., Dodson R . J ., Haft D . H ., Hickey E . K ., Peterson L . D ., Nelson W . C ., Ketchum K .A ., McDonald L ., Utterback T .R., Malek J .A ., Linher K . D Ga Rrett M . M ., Stewart A . M ., Cotton M.D., Pratt M .S., Phollips C. A Richardson D ., Heidedelberg J ., Sutton G ; G ., Fleischmann R .D ., Eisen J.A White O ., Salzberg S .L ., Smith H ;O., Venter J ; C.And Fraser C .M., (1999).- Evidence for lateral gene transfer between archaea and bacteria from genome sequence of *thermotogamaritima* . *nat* **399** . ; 323-329.
- 49) Nanjwad b ., chandrashehara s ., goudanavar P. s., shamarez a .m ., manvi f ., 2010.- Production antibiotic from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities.
- 50) Odile M., 2004.- Biosynthèse des isoprénoïdes : synthèses d'analogues du 1-désoxy-D-xylulose 5-phosphate, inhibiteurs potentiels de la voie du méthylérythritol phosphate , page 8-12.
- 51) Omura S., Tanaka J. 1986. Biosynthesis of tylosine and its regulation by ammonium and phosphate. In: Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G (Eds), Regulation of secondary metabolites. VCH Publishers Inc. Berlin. 306-332pp.
- 52) Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A., 2003.- Microbiologie. De Boeck & Larcier. France
- 53) Petrosyan P., Gacia-Varela M., Madrigal A., Huitron C. Et Flores M. E., 2003.- *Streptomyces mexicanus* sp. Nov., axylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter. J. Syst. Evol. Microbiol* **53**, 269-273.
- 54) Poyart C., 2002.- Origine et évolution de la résistance aux antibiotiques. Bactériologie générale, édition : Faculté de médecine Necker – Enfants-Malades.
- 55) Patel, J. B., 2001.- 16S rRNA gene sequencing for bacterial pathogen identification in the clinical laboratory. *Mol. Diagn.* **6**:313-321.
- 56) Perry John D. Amanda L. Jones, 1, 2 June M. Brown, 3 Vachaspati Mishra, 4, 2 Arnold G. Steigerwalt 3 and Michael Goodfellow 1 ., 2004.- *Rhodococcus gordoniae* sp. nov., an actinomycete isolated from clinical material and phenol-contaminated soil page 409



- 57) Pachaiyappan S K., John P, P ,R, Veeramuthu D, Savarimuthu I.,2012.-By the Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine. All rightsreservedjournal homepage: www.elsevier.com/locate/apjtb
- 58) Rivas R., Sanchez M., Trujillo M. E., Zurdo-Pineiro J.L., Mateos P.F., Martinez – Molina E .Et Velazquez E.,2003.-Xylanimonascellulosicagen .nov., a xylanolyticbacteriumisolatedfrom a decadedtree (uimusnigra ).inter .j. syst .evol . microbiol.**53**,99-103.
- 59) Rajan B. M. Et Kannabiran K.,2010.-Antimicrobialactivity of *Streptomycesalbofaciensvitbrk1* spp. isolatedfrom the bay of Bengalcoast of Tamil Nadu, India.*Pharmacologyonline*. 1: 124-132.
- 60) Stackebrandt E., And Goebel B. M., 1994.-Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequences analysis in the presentspeciesdefinition in bacteriology,*Int. J. Syst. Bacteriol.*, vol. **44**, pp. 846-849.
- 61) Stackebrandt *et al.*, 2006.(2006).-The FamilyActinomycetaceae: The Genera*Actinomyces*, *Actinobaculum*, *Arcanobacterium*,*Varibaculum*, and *Mobiluncus*.*Prokaryotes*3:430–537
- 62) Smaoui Salim., 2010.- Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. p251.
- 63) Singh Sb, BarrettJf.,2006.-Empiricalantibacterialdrugdiscoveryfoundation in naturalproducts. *Biochem. Pharmacol.* 71: 1006-1015
- 64) Stéphanie Coumes Florens., 2011.-Les modules de détection/résistance auxantibiotiques peptidiques chez les Firmicutes , page 30-40
- 65) Sanchez, S. and Demain, A. L. (2002).Metabolicregulation of fermentation processes. *EnzyMicrobTechnol* 31, 895-906.
- 66) Strub C. 2008. Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrixalgeriensis*. Thèse de doctorat. Université de Toulouse INP-ENSAT. France.174p.
- 67) Thomson C.J., Power E., Ruebsamen-Waigmann H., Labischinski H., 2004.- Antibacterialresearch and development in the 21st Century-an industry perspective of the challenges. *Current Opinion inMicrobiology*, .7(5):445-50)
- 68) Thomas L, 2008., Associations biologique entre les termites du genre nasutitermes et leur microflore actinomycèteale :spécificité et névolution.page 22.
- 69) Wang L.,Huang Y., Lin Z., Goodfellow M . And Rodriggues C., 2006.- Streptacidiphilusaryzaesp . Niv., an actinomyceteisolatedfromrice – filndsoil in thailand .J. Ev . Microbiol., 56 . 1257-1261.

- 70) Walsh, C. 2003.**-Antibiotics: actions, origins, resistance. American Society for Microbiology, Washing,D.C.ton. page 345
- 71) Zailtin B And Watson S.B .,2006.**-Actenimycetes in relation taste and odour in drinking :water :myths .tenets and truths water reseach ,40,1741-1753.
- 72) ZeghiletN , 2009.**-Optimisation des paramètres de détection et de quantification des résidus d'antibiotiques dans la viande blanche par chromatographie liquide haute performance (HPLC).page 28-40

**Les sites électroniques**

**-Site1**

- WWW. EUZEBY2013 .COM

**-site 2**

[http://www.google.dz/search?q=photo+actinomycètes+sur+microscopique&hl=fr-DZ&gbv=2&tbm=isch&prmd=ivns&ei=PpyJU9n\\_EvGu7AbehoCoCg&start=20&sa=N](http://www.google.dz/search?q=photo+actinomycètes+sur+microscopique&hl=fr-DZ&gbv=2&tbm=isch&prmd=ivns&ei=PpyJU9n_EvGu7AbehoCoCg&start=20&sa=N).

**-site 3**

[http://www.google.dz/search?q=photo+actinomycètes+sur+microscope+optique&rlz=1C1\\_\\_\\_\\_\\_enDZ578DZ578&tbm=isch&ei=e52JU42rJ8uI7AauuYGYAg&start=20&sa=N](http://www.google.dz/search?q=photo+actinomycètes+sur+microscope+optique&rlz=1C1_____enDZ578DZ578&tbm=isch&ei=e52JU42rJ8uI7AauuYGYAg&start=20&sa=N).

**-site 4**

[Http://www.google.dz/images?hl=frDZ&gbv=2&spell=1&sa=X&oi=image\\_result\\_group&ei=cwanu\\_sylrtw0gxrlcobw&ved=0CB8QsAQ&q=photo%20actinomycètes%20sur%20microscope&tbm=isch](Http://www.google.dz/images?hl=frDZ&gbv=2&spell=1&sa=X&oi=image_result_group&ei=cwanu_sylrtw0gxrlcobw&ved=0CB8QsAQ&q=photo%20actinomycètes%20sur%20microscope&tbm=isch)

## Annexes

**Milieu GYEA (Athalye *et al.*, 1981):** Extrait de levure: 10 g; glucose: 10 g; agar: 18 g; eau distillée q.s.p.: 1000 mL. pH = 6,8.

**Milieu Amidon-asparagine (AAS):** Amidon soluble: 20 g; asparagine: 2 g; MgSO<sub>4</sub>: 1 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,1 g; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,5 g; agar: 20 g; eau distillée q.s.p.: 1000 mL. pH = 7,2.

**Milieu Amidon-caséine (ACA):** Amidon soluble: 2 g; caséine: 4 g; solution saline (voir ISP3): 1 mL; agar: 20 g; eau distillée q.s.p.: 1000 mL. pH = 7,2.

## Résumé

L'objectif de notre travail est de rechercher des milieux de culture solides favorables à la production d'antibiotiques secrétés par des actinomycètes. Pour cela, nous avons choisi deux milieux de culture complexes solides couramment utilisés pour l'étude morphologique des actinomycètes (ISP2) et (Bennett). Et à partir de ces milieux, nous avons créé huit autres, en soustrayant un composant ou plus de leurs compositions. Pour déterminer les meilleurs milieux nous avons mesuré l'activité antagoniste de la souche d'actinomycète (G61 ou B31) contre le germe test (*Candida albicans* ou *Bacillus subtilis*) dans chaque milieu de culture en utilisant la technique de la double couche. Nous n'avons pas remarqué une grande différence entre les activités apparues au milieu MA0 (ISP2) et ses milieux dérivés MA1, MA2, et MA3. Et ce pour les deux souches d'actinomycètes. Par contre, le fait inhibiteur des deux actinomycètes au milieu MB0 (Bennett) et ses dérivés MB1, MB2, MB3, MB4 et MB5 a enregistré certaines anomalies. En effet, la souche G61 a révélé une très bonne activité dans le milieu MB5 (à base de glucose et peptone) plus spécialement contre le germe test *Bacillus subtilis*. A son rôle la souche B31 a montré une bonne activité contre *Bacillus subtilis* dans le milieu MB3 et contre *Candida albicans* dans les milieux MB1 et MB2.

**Mots clés:** Milieu de culture, actinomycète, antibiotique

## ملخص:

الهدف من عملنا هذا هو البحث عن أوساط زراعية صلبة أكثر ملاءمة لإنتاج المضادات الحيوية المفترزة من طرف البكتيريا الهيفية. من أجل ذلك اخترنا وسطين زراعيين مركبين صلبين أكثر استعمالا في الدراسة المرفولوجية لهذه البكتيريا (ISP2) و (Bennett) الأفضل، قمنا بقياس النشاط التضادي لسلسلة الأكتينومييسات G61 أو B31 ضد سلسلة الاختبار *Candida albicans* أو *Bacillus subtilis* في كل وسط زراعي باستعمال تقنية الطبقة المزدوجة. لم نلاحظ اختلافا هاما في النشاط الظاهر في الوسط MA0 (ISP2) وكذا الأوساط المشتقة منه MA1، MA2، MA3. بخلاف ذلك لاحظنا اختلافا متباينا في النشاط في الوسط MB0 (Bennett) و الأوساط المشتقة منه MB1، MB2، MB3، MB4 و MB5. حيث أظهرت السلالة G61 فعالية كبيرة في الوسط MB5 خاصة ضد سلسلة الاختبار *Bacillus subtilis* و بدورها السلالة B31 أظهرت فعالية هامة ضد سلسلة الاختبار *Bacillus subtilis* في الوسط MB3 و ضد سلسلة الاختبار *Candida albicans* في الوسطين MB1 و MB2.

**كلمات مفتاحية:** وسط زراعي، بكتيريا هيفية، مضاد حيوي