

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



Université Abbès Laghrour-Khenchela-  
Faculté de Science de la Nature et de la Vie  
Département de Biologie

Mémoire en vue de l'Obtention du Diplôme de :  
Master en Microbiologie

Option :  
Biologie Moléculaire et Cellulaire

Thème

---

**EFFETS ANTAGONISTES ENTRE DES SOUCHES  
D'ACTINOMYCETES ET DES MICROORGANISMES PATHOGENES  
ET PHYTOPATHOGENES**

---

Présenté par :  
**DEKHOUCHE Soumia**

Devant le jury : Président : SBIHI Fatima (M. A. A)  
Examineur : LABANI F. Kenza (M.A.A)  
Promoteur : LEULMI Nassima (M.A.A)  
Invité : Pr. DERBOUCHE A.

U.A. Laghrour -Khenchela-  
U.A. Laghrour -Khenchela-  
U.A. Laghrour -Khenchela-  
U.A. Laghrour -Khenchela

Promotion : Juin, 2014

## *Dédicace*

*Je dédie ce travail à mes très chers parents qui m'ont aidé tout au long de mon parcours éducatif et qui m'ont montré qu'il ne faut jamais baisser le bras pour atteindre mon but, et que la réussite va avec la discipline et que ce travail aille à mes chers frères, sœurs et surtout ma mère pour son encouragement continuel.*

DEKHOUCHE Soumia





## Remerciements

Ce mémoire a été réalisé au Laboratoire de microbiologie, Institut de biologie, Hammam, Université KHENCHELA

En premier lieu, je remercie Dieu le Tout Puissant de m'avoir donné la volonté, la santé et le courage pour réaliser ce travail.

Je tiens à remercier tout d'abord **Melle LEULMI N.** Maître assistante classe A, pour avoir accepté de m'encadrer et de me diriger ainsi que pour les discussions enrichissantes. Merci pour ces conseils, orientations et ses encouragements.

Je remercie également Madame **SBIHI H.** maître assistante classe A, pour avoir accepté de présider le jury, qu'il soit assuré de ma sincère gratitude.

Mes remerciements également à **Melle LABANI f/k.** Maître assistante classe A qui m'a fait l'honneur de participer à ce jury.

Finalement, je remercie toute personne ayant contribué de près ou du loin à la réalisation de ce travail.

*DEKHOUCHE Soumia*

## *Liste des figures*

	<b>Pages</b>
<b>Figure N°1 : Cycle de développement de <i>Streptomyces griseus</i> (Horinouchi, 2002).....</b>	<b>6</b>
<b>Figure N°2 : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (Prescott <i>et al.</i>, 2003).....</b>	<b>7</b>
<b>Figure N°3 : Principaux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane (Walsh <i>etal.</i> ,2001).....</b>	<b>12</b>
<b>Figure N°04: principaux antibiotiques inhibiteurs de synthèses protéiques (Walsh <i>et al.</i>, 2001).....</b>	<b>13</b>
<b>Figure N° 05 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Walsh <i>et al.</i>, 2001).....</b>	<b>13</b>
<b>Figure N° 6: Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates (Walsh <i>et al.</i>, 2001).....</b>	<b>14</b>
<b>Figure N° 7. Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. (Hemaiswarya <i>et al.</i>, 2008).....</b>	<b>15</b>
<b>Figure N° 08: Extraction d'antibiotique de l'extrait acétate d'éthyle.....</b>	<b>19</b>
<b>Figure N° 09: Extraction d'antibiotique de l'extrait acétone.....</b>	<b>19</b>

<b>Figure 10 : Quelques photos prises de l'activité antibactériennes des actinomycétales testes.....</b>	<b>22</b>
<b>Figure 11 : Quelques photos prises de l'activité antifongiques des actinomycétales testes.....</b>	<b>24</b>
<b>Figure N° 12 : Activité anti <i>Streptomyces scabies</i> des souches actinomycétales.....</b>	<b>25</b>
<b>Figure 13 : Cinétique de production de molécules bioactives par la souche sélectionnée lactuca.....</b>	<b>26</b>
<b>Figure 14 : Extrait acétonique de milieu liquide (a) et acétatique de milieu solide.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 15 : Activité antibactérienne des extraits organique de l'antibiotique mise en évidence par la technique des disques.....</b>	<b>27</b>
<b>Figure 16 : Test de l'effet antibactérien de l'extrait lactuca (100µl, 50µl, 25µl).....</b>	<b>29</b>
<b>Figure 17 : Chromatographie sur couche mince (CCM) de la souche lactuca.....</b>	<b>30</b>
<b>Figure 18: La bioautographie des taches séparées contre les trois souches test.....</b>	<b>31</b>



## *Liste des tableaux*

	<b>Pages</b>
<b>Tableau N° 1 : Différentes Substances produites par les actinomycètes.....</b>	<b>10</b>
<b>Tableau N° 2 : Les différents sites d'isolement des souches actinomycétales étudiées...16</b>	<b>16</b>
<b>Tableau N°3 : Les souches bactériennes utilisées comme testes.....16</b>	<b>16</b>
<b>Tableau N°4 : les champignons testés et leurs sites de prélèvement.....17</b>	<b>17</b>
<b>Tableau N° 5 (a, b et c) : Activité antibactérienne des souches actinomycétales mise en évidence par la technique d'agar .....</b>	<b>21</b>
<b>Tableau N° 6 : Activité antifongique des souches actinomycétales mise en évidence par la technique d'agar (a, b et c).....</b>	<b>23</b>
<b>Tableau N° 7 : Activité anti- <i>Streptomyces scabies</i> des souches actinomycétales mise en évidence par la technique d'agar (a, b, c).....</b>	<b>25</b>
<b>Tableau 8: Activité antibactériennes en mm des extraits organiques (acétate d'éthyle et acétone) de la souche lactuca vis-à-vis des bactéries tests.....</b>	<b>28</b>
<b>Tableau 9: Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle (technique de disque).....</b>	<b>29</b>
<b>Tableau 10 : Biautographie du chromatogramme de lactuca.....</b>	<b>30</b>

## *Tables des matières*

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

### **Revue bibliographie**

#### **Chapitre 01 : Les caractéristiques des actinomycètes**

1.Généralité.....	3
I.2.Classification des actinomycètes.....	4
I.3. Le cycle de développement des actinomycètes.....	5
I.4. Mycélium du substrat et mycélium aérien des actinomycètes.....	6
I.5. Formation des spores par les actinomycètes.....	7
I.6. Le matériel génétique des actinomycètes.....	8
I.7. Distribution des actinomycètes dans la nature et pathogénéicité.....	8
II.Substances bioactives produites par les actinomycètes.....	9
7.1. Les antibiotiques.....	9
7.2.Les extremozymes.....	9
7.3.L'utilisation des actinomycètes comme bio insecticides et bio pesticides.....	10

#### **Chapitre 02 : Production d'antibiotique par les actinomycètes**

1.Définition des antibiotiques.....	11
2.Classification des antibiotiques.....	11
3. Résistance aux antibiotiques.....	11
4.Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux agents antibactériens.....	14

#### **Matériel et méthodes**

Les souches étudiées.....	16
I. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	16
I.1.Activité bactérienne.....	16
I.1.1. Préparation des inocula de bactéries-tests.....	16
I.1.2. Technique des cylindres d'Agar.....	17

I.2. Activité antifongique.....	17
II. Interaction Actinomycètes – Actinomycète.....	18
III. Cinétique de La production des substances antimicrobiennes.....	18
IV. Extraction de la molécule bioactive (antibiotique).....	18
IV.1. Extraction à partir du milieu solide .....	18
IV.2. à partir de milieu liquide .....	19
V. Test de l'activité antibactérienne des extraits organiques d'antibiotiques.....	19
VI. Séparation des molécules bioactives .....	20
VI.2. La bioautographie .....	20

### **Résultat et discussion**

I. La mise en évidence de l'activité antimicrobienne.....	21
I.1. Activité antibactérienne.....	21
I.2. Activité antifongique.....	23
I.3. Activité antibactérienne antiphytopathogène.....	25
II. Cinétique de la production des substances antimicrobiennes.....	26
III. Test d'activité des extraits milieu solide et milieu liquide.....	27
IV. Effet du volume de l'extrait d'antibiotique, obtenu à partir du milieu solide, sur l'activité antimicrobienne.....	29
V. CCM analytique unidimensionnel .....	30
VI. La bioautographie.....	31
Conclusion générale et perspectives.....	33
Références bibliographiques.....	35

### **Annexes**

### **Résumé**

# *Introduction*

La découverte des antibiotiques à la fin des années 1940 a marqué une étape capitale dans la lutte contre les maladies infectieuses. Ces traitements ont permis d'épargner un grand nombre de vie et l'on accru, un peu trop vite, que les maladies infectieuses seraient un jour toutes jugulées. En effet, cette introduction aurait dû provoquer une catastrophe chez les microbes, mais plasticité génétique leur a permis, non seulement de survivre, mais même de prospérer dans cet environnement hostile. Ainsi, on assiste de plus en plus au développement de souches microbiennes résistantes aux molécules bioactives (**Davies et Mazel, 1994**). Même les organismes ou toutes les souches restent sensibles à la pénicilline, comme *Streptococcus pyogenes* (bactérie responsable d'angine, de la scarlatine et de rhumatismes articulaires) exigent maintenant des doses plus fortes de pénicilline qu'il y a dix ans, pour une efficacité de traitement égale (**Madigan et Martinko, 2007**).

Quelques germes pathogènes ont développé une résistance à tous les agents antimicrobiens connus. Parmi ces derniers on peut recenser plusieurs souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA), d'*Enterococcus faecium* résistantes à la vancomycine (VRE) ainsi que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (**Livermore, 2004**). Un nombre croissant de souches MRSA résistantes à la vancomycine est apparu au Japon (**Hiramatsua et al., 1997**) puis aux USA (**CDCCP, 1997**) et en France (**Poly et al., 1998**). Les infections causées par les bactéries résistantes aux antibiotiques sont responsables d'un taux élevé de morbidité et de mortalité, comparée aux infections causées par les bactéries sensibles aux antibiotiques (**Haffas Maamar, 2009**).

Ainsi, l'OMS a adopté, en 2001, une résolution «sécurité sanitaire internationale : alerte et riposte en cas d'épidémie» et a révisé, en 2007, le Règlement Sanitaire International. Il est donc essentiel de reconnaître leur importance, de prendre la mesure de leurs risques, et de mettre en œuvre des politiques adéquates de lutte et de prévention à l'échelon national, régional et international (**Mesbah, 2009**), par la connaissance des mécanismes biochimiques et du support génétiques de la résistance afin de permettre, au plan médical, de guider les choix thérapeutiques et la politique antibiotique (**Courvalin et Philippon, 1990**).

Devant cette émergence de l'antibiorésistance, la découverte de nouvelles molécules représente donc un besoin qui ne peut être comblé que soit par :

L'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées (**Kitouni, 2007**).

La réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure connue ou la synthèse de nouveaux dérivés (**Kitouni, 2007**).

L'analyse des produits de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques isolées d'écosystèmes peu ou pas explorés (**Kitouni, 2007**).

Pour ces trois approches, les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production d'antibiotiques notamment les bactéries appartenant au genre *Streptomyces* dont plus de la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement sont produits par ces bactéries filamenteuses telluriques qui sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables de synthétiser des molécules naturelles par le biais de leur métabolisme secondaire.

A ce titre nous nous sommes fixés comme objectif essentiel la recherche de substances antimicrobiennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes par utilisation de la technique du cylindre d'agar. Ce test est réalisé sur divers agents pathogènes (bactéries, champignons). Puis, l'étude de la cinétique de la production des substances antimicrobiennes, l'extraction de l'antibiotique produit par Lac1 avec deux solvants pour tester leur activité vis-à-vis des souches testées pathogènes, et la séparation des molécules bioactives grâce à leur identification par la chromatographie sur couche mince (CCM).

La première partie de ce mémoire est une synthèse bibliographique : le premier chapitre représente une description générale d'actinomycète : morphologie, génétique, ... etc. Le deuxième chapitre représente l'antibiotique produit par cette souche.

La partie matériel et méthode décrit l'ensemble du matériel biologique et technique utilisées lors des manipulations effectuées.

Les résultats sont présentés dans la troisième partie de ce mémoire accompagnés d'une discussion spécifique.

La conclusion générale sur le travail clôture ce manuscrit et met en évidence les perspectives de recherche.

## *Liste de l'abréviation*

ADN : Acide desoxyribonucléique.

ARN : Acide ribonucléique

ATCC: American Type Culture Collection

CCM: Chromatographie sur couche mince

CHU: Centre Hospital Universities

g : gravité

HPLC :

MRSA : méthicilline résistant *Staphylococcus aureus*

OMS : organisation mondiale de la santé

PDA : Potato Dextrose Agar

Rf : rapport frontal

sp : Espèce

U.F.C : Unité Format une Colonie

YMEA : Yeast malt extract agar

**Tableau N° 5 (a, b et c) : Activité antibactérienne des souches actinomycétales mise en évidence par la technique d'agar**

(a)

Les souches tests.	SF1	SF2	SF10	SF11	Lac1	Pro1	Pro2	Pro3	Pro4
<i>Bacillus Creus</i>	24	–	28	19	25	–	22	20	–
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	31	25	36	25	30	–	25	25	–
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	29	23	30	25	26	20	25	31	–
<i>Enterobacter</i>	29	–	26	23	39	–	30	21	–
<i>Providencia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Morganilla morgani</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Proteus</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Klebseila pneumonia</i>	–	–	–	–	–	–	–	–	–
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	–	–	–	–	–	–	22	–	–
<i>Pseudomonas earugenosae</i>	–	faible	–	–	–	–	14	15	13

(b)

Les souches tests	Pro5	Pro6	CT1	CT6	CT8	SFKH1	SFKH3	SFKH4	CT5
<i>Bacillus cereus</i>	25	20	28	31	28	11	10	21	29
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43	28	25	21	28	20	15	20	32	30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25	28	30	–	21	20	11	–	22	20
<i>Enterobacter</i>	30	20	30	28	30	–	–	–	28
<i>Providencia sp.</i>	–	–	–	–	–	–	–	Très faible	–
<i>Morganilla morgani</i>	–	–	–	–	–	–	–	21	–
<i>Proteus sp.</i>	–	–	–	–	–	–	–	Très faible	–
<i>Klebseila pneumonia</i>	–	–	–	–	–	–	–	30	–
<i>Esherichea coli</i> ATCC25922	30	26	30	28	30	–	–	15	35
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21	21	13	15	14	–	faible	12	15

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

(c)

Les souches tests	SFKH5	SFKH6	SFKH7	SFKH8	SFKH9	SFKH10	SFKH11
<i>Bacillus cereus</i>	-	10	10	-	16	30	30
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43	-	17	15	11	20	30	-
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25	-	15	-	-	30	25	-
<i>Enterobacter</i>	-	-	-	-	-	31	35
<i>Providencia</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganila morgani</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus sp.</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Klebseila pneumonia</i>	-	-	-	-	-	-	24
<i>Escherichia coli</i> ATCC25922	-	-	-	-	-	30	28
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	-	Activité très faible	-	-	-	-

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

**Tableau N° 6 : Activité antifongique des souches actinomycétales mise en évidence par la technique d'agar (a, b et c)**

(a)

Les souches tests (diamètre en mm)	SF1	SF2	SF10	SF11	Lac1	Pro1	Pro2	Pro3	Pro4
<i>Aspergillus niger</i>	10	21	15	17	-	-	26	23	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindrosporium</i>	22	17	18	18	-	-	22	25	12
<i>Alternaria sp</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	22	17	18	24	-	20	24	26	-
<i>Cladosporium</i>	27	34	29	38	-	25	24	24	30
<i>Auérobasidium</i>	34	32	34	38	-	33	35	29	33

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

(b)

Les souches tests	Pro5	Pro6	CT1	CT6	CT8	SFKH1	SFKH3	SFKH4	CT5
<i>Aspergillus niger</i>	17	20	-	-	Très faible	-	-	-	-
<i>Trichophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindrosporium</i>	25	22	15	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	30	20	26	15	-	4	-	20	-
<i>Cladosporium</i>	31	30	35	33	-	-	-	-	27
<i>Auérobasidium</i>	32	37	37	36	-	-	-	-	34

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

(c)

Les souches tests	SFKH5	SFKH6	SFKH7	SFKH8	SFKH9	SFKH10	SFKH11
<i>Aspergillus niger</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Trychophyton rubrum</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Cylindrosporium</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Alternaria sp</i>	-	-	-	-	-	-	-
<i>Fusarium oxysporum</i>	-	-	-	10	-	20	-
<i>Cladosporium</i>	-	20	-	faible	15	15	Faible
<i>Auérobasidium</i>	-	-	-	-	-	-	-

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

Tableau N° 7 : Activité anti- *Streptomyces scabies* des souches actinomycétales mise en évidence par la technique d'agar (a, b, c).

(a)

Les souches tests	SF1	SF2	SF10	SF11	Lac1	Pro1	Pro2	Pro3	Pro4
<i>Streptomyces scabies</i>	15	14	9	15	38	10	24	17	-

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

(b)

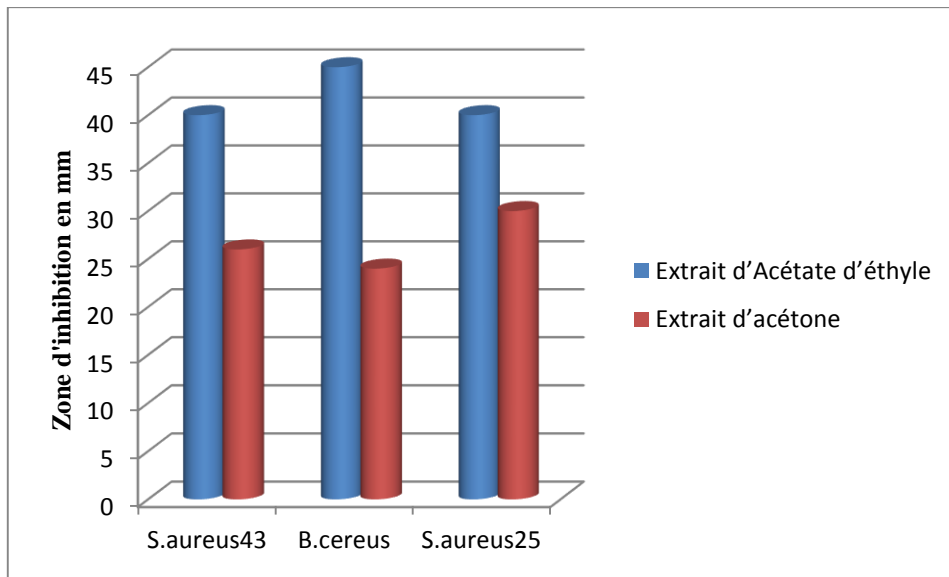
Les souches tests	Pro5	Pro6	CT1	CT6	CT8	SFKH1	SFKH3	SFKH4	C T5
<i>Streptomyces scabies</i>	18	11	14	14	23	10	15	28	11

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.

(c)

Les souches tests	SFKH5	SFKH6	SFKH7	SFKH8	SFKH9	SFKH10	SFKH11
<i>Streptomyces scabies</i>	15	18	-	-	28	35	28

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.



**Figure 15 : Activité antibactérienne des extraits organique de l'antibiotique mise en évidence par la technique des disques**

**Tableau N° 2 : Les différents sites d'isolement des souches actinomycétales étudiées.**

<b>Souches Actinomycètes</b>	<b>Site de prélèvement</b>
1/ Lactuca	Sol rhisosphérique de la région de Batna
2/ ProSG2	Lac Guerra Guellif en surface / Oum El Bouahgi
3/ ProSG3	Lac Guerra Guellif en surface / Oum El Bouahgi
4/ ProSG4	Lac Guerra Guellif en surface / Oum El Bouahgi
5/ProSG5	Lac Guerra Guellif en surface / Oum El Bouahgi
6/ ProSG6	Lac Guerra Guellif en surface / Oum El Bouahgi
7/ SF10	Sol forestier, Hamma, Khenchela
8/ CT5	Chat tizougaghet en surface / Khenchela
9/ SF1	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
10/SF2	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
11/SF11	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
12/CT1	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
13/CT6	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
14/SFKH1	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
15/SFKH2	Sol forestier rhisosphérique, Hamma / Khenchela
17/SFKH3	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
18/SFKH4	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
19/SFKH5	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
20/SFKH6	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
21/SFKH7	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
22/SFKH8	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
23/SFKH9	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
24/SFKH10	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
25/SFKH11	Sol forestier rihosphérique, Hamma / Khenchela
26/Ct8	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela

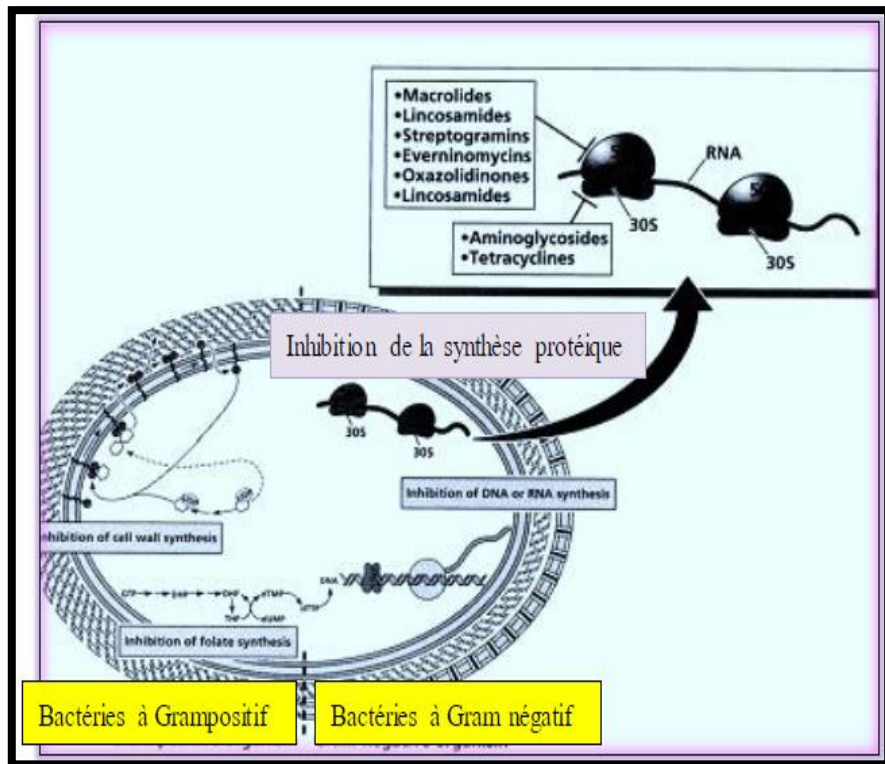


Figure N°04: principaux antibiotiques inhibiteurs de synthèses protéiques (Walsh *et al.*, 2001)

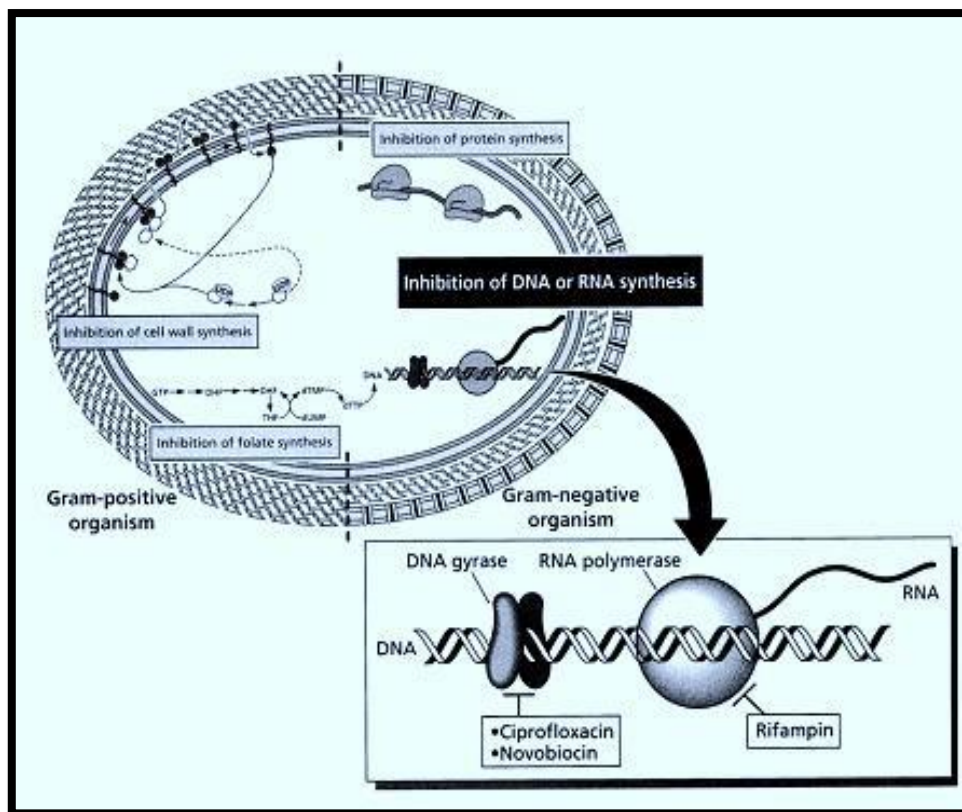


Figure N° 05 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Walsh *et al.*, 2001)

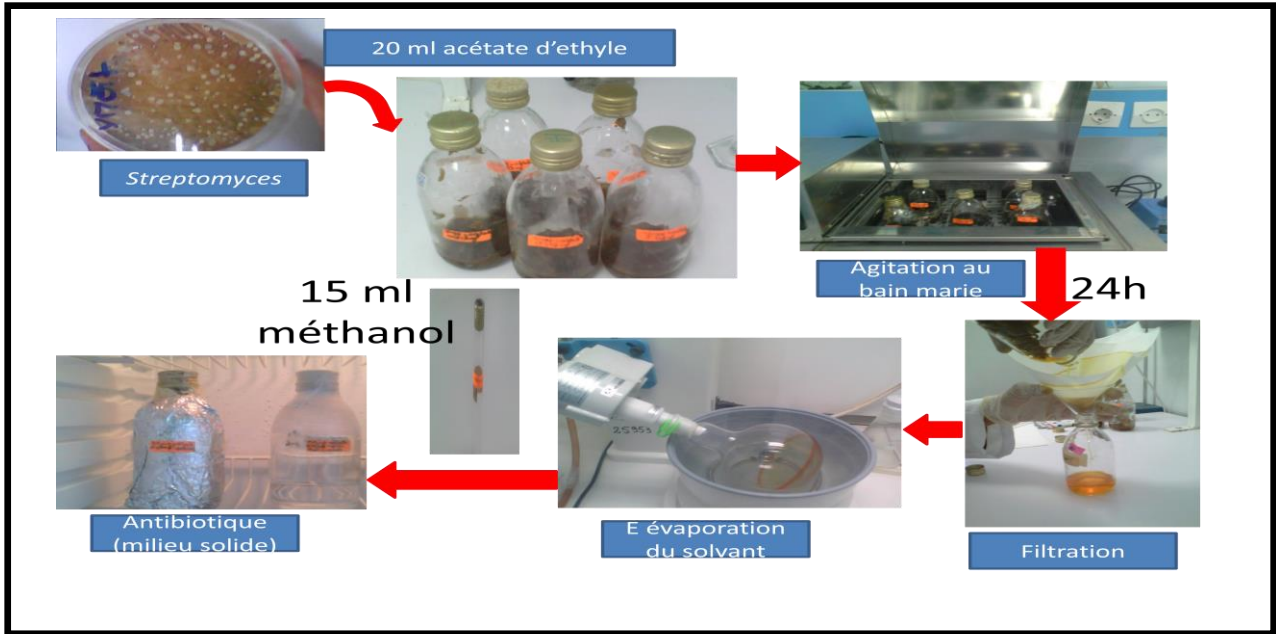


Figure N° 08: Extraction d'antibiotique de l'extrait acétate d'éthyle.

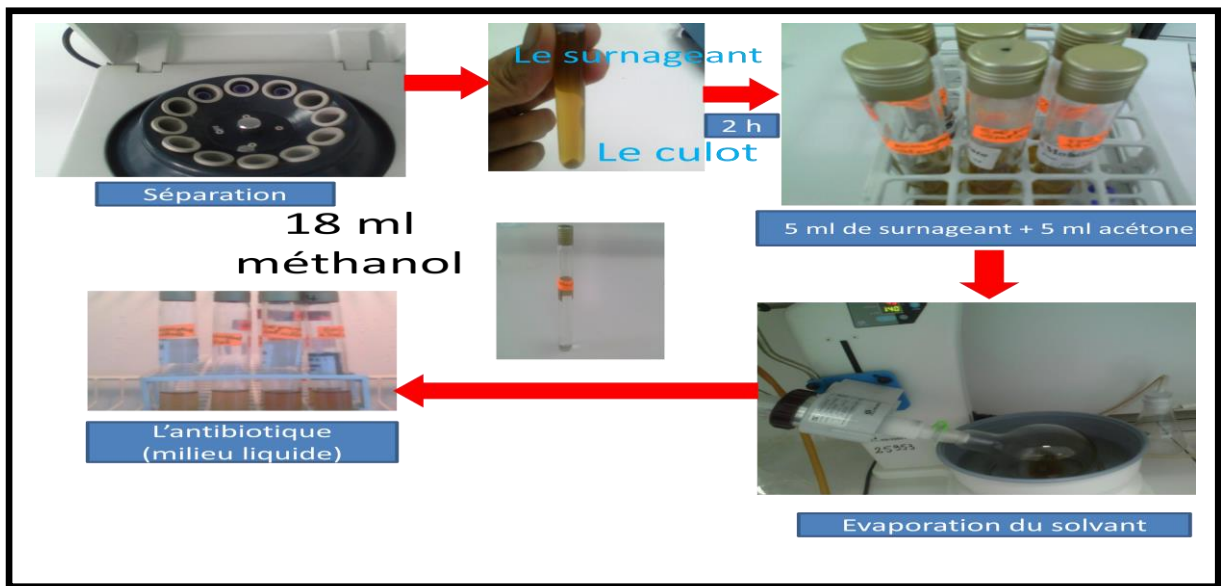


Figure N° 09: Extraction d'antibiotique de l'extrait acétone

## Résultats et discussions

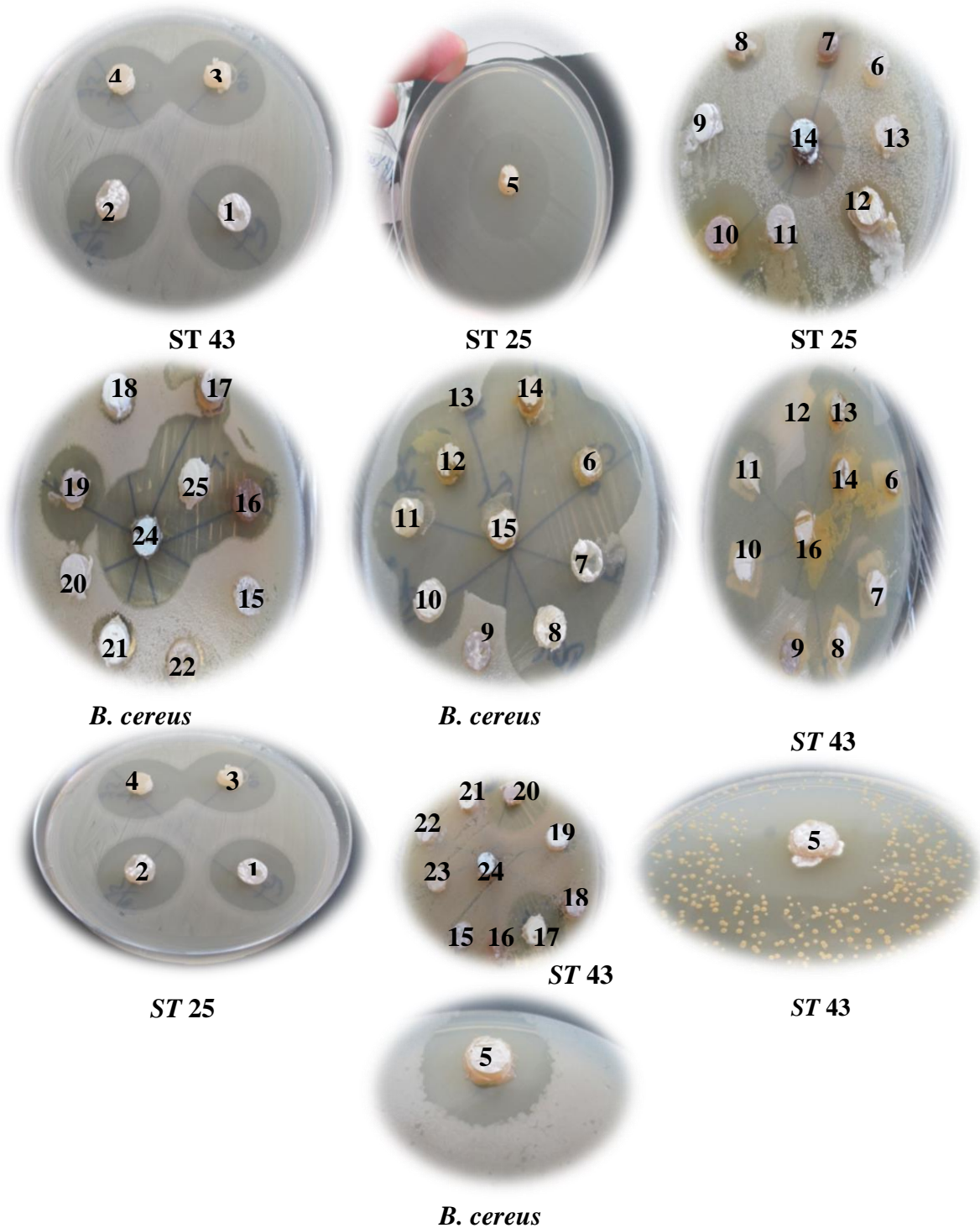
### I. L'activité antimicrobienne des souches d'actinomycétales testées

Un total de Vingt cinq souches d'actinomycètes a été testé. Les isolats obtenus sont repiqués sur milieu YMEA + CaCO<sub>3</sub>, conservés sur YMEA inclinée à +4 °C.

#### 1. L'activité antibactérienne

Les résultats du test d'activité a été bien montre dans le tableau 5 (a, b et c) et les figure 10. En ce qui concerne les germes tests, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des actinomycètes en comparaison avec les bactéries à Gram négatif. Selon **Taker al.** L'or de la manipulation des nouveaux métabolites secondaires, les actinomycètes sont souvent rencontrés et ils montrent une activité antimicrobienne plus active contre les bactéries Gram positives que des bactéries Gram négatif. Cette différence de sensibilité des deux types bactériens peut être expliquée par la différence morphologique, les Gram négatif possèdent une membrane de nature lipopolysaccharidique qui rend la paroi imperméable aux substances hydrosolubles (polaires). Tandis que les Gram positif plus susceptibles disposent d'une couche externe de peptidoglycane qui n'est gère une barrière imperméable efficace contre ce genre de molécules.

On peut dire aussi que l'activité détecter contre les germes à Gram négatifs est aussi importante vis-à-vis : *Providencia sp*, *Klebseila Pneumoniae*, *Morganilla morgani*. Les trois souches SF1, SF2, SF 10 et SF 11 se révèlent êtres plus actifs sur les souches testes suivantes : *S.aureus*43, *S.aureus* 25et *Bacillus cereus*. (Figure 10). Les actinomycètes ont montrés une activité importante vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ce qui a été confirmé avec les travaux de **Devi NKA et al.** (2006) et **Valli S et al** (2012) mais les contredisait lorsqu'il s'agisse de *Pseudomonas aeruginosa* car ils se sont tous avérés inactifs contre cette espèce bactérienne. La souche lactuca 1 enregistre le plus gros diamètre d'inhibition soit 30, 32, 28 mm respectivement contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* 43 et *S. aureus* 25.



1 :SF1 , 2 : SF2, 3 :SF10, 4 : SF11, 5 : Lac1, 6 : Pro1, 7 :Pro2, 8 : Pro2, 9: Pro3, 10: Pro4,11: Pro5, 12: Pro6, 13: CT1, 14: CT6, 15: CT5, 16: SFKH1, 17: SFKH3, 18: SFKH4, 19:SFKH5, 20:SFKH6, 21:SFKH7, 22:SFKH8, 23: SFKH9, 24:SFKH10, 25:SFKH11.

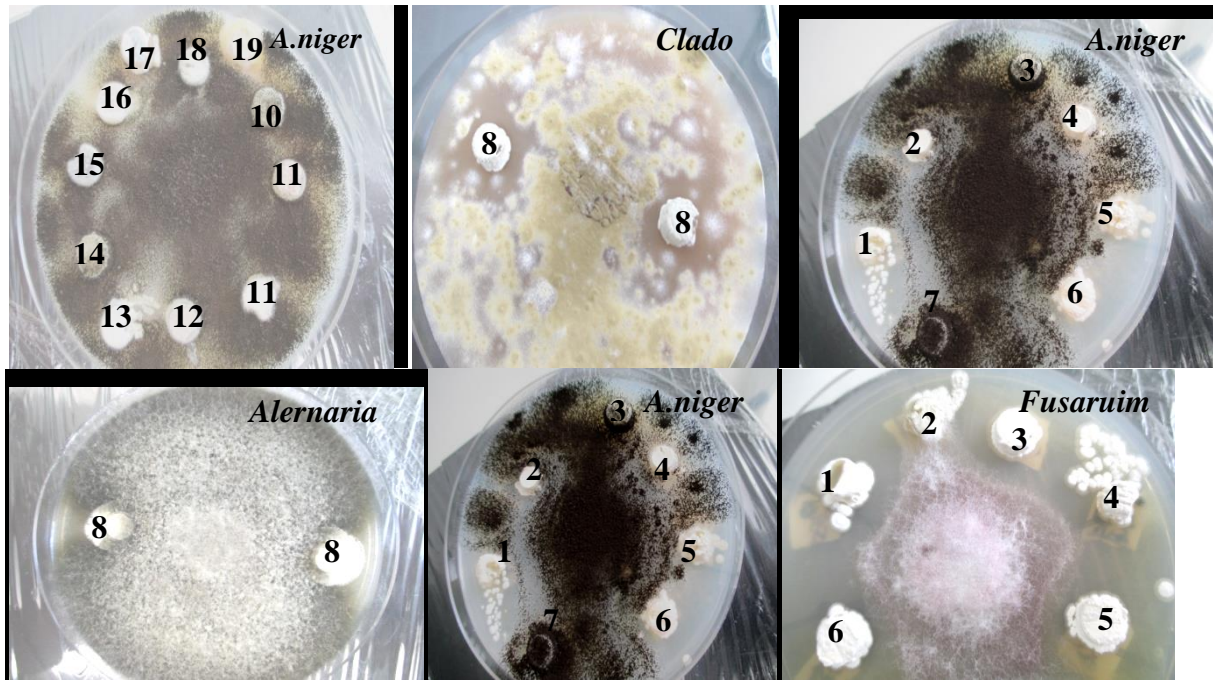
Figure 10 : Quelques photos prises de l'activité antibactériennes des actinomycétales testes

## 2. Activité antifongique

Les résultats de l'antagonisme des isolats d'actinomycètes testés contre les champignons phytopathogènes sont rapportés dans le (tableau 6 et figure 11). Il est bien évident que la croissance des espèces fongiques a été inhibée par les cultures d'actinomycètes, lorsqu'elles sont cultivées conjointement sur milieu PDA. Les isolats provenant de sols rhizosphériques de la région d'Elhamma, présentent une activité antagoniste significative en comparaison avec celles des autres isolats. Les souches actinomycétales SF1, SF2, SF10, SF11, Pro2, Pro3, Pro5, Pro6 apparaissent très active contre tous les champignons tests. Cependant la souche CT5 ne présente aucune activité vis-à-vis les champignons testés.

Les souches : SF1, SF2, SF10, SF11, Pro2, Pro3, Pro4, Pro5, Pro6 manifestants une intense activité contre tous les champignons tests. La souche CT6 sont active contre *Fusarium oxysporum* et *Cladosporium*. Alors que, aucune activité vis-à-vis *Aspergillus niger*. La souche CT1 présente une activité contre *Cylindrosporium* avec un diamètre de 15mm.

Les actinomycètes suivants : CT6, SFKH1, SFKH3, SFKH4, SFKH5, SFKH6, SFKH7, SFKH8, SFKH9, SFKH10 montrent inactif envers *Aspergillus niger* et *Cladosporium*. A partir de ces résultats, on peut conclure que la souche Lac1 a donné des meilleurs résultats par rapport les souches actinomycétales étudiées. En effet, les réactions d'antagonismes qui exercent les actinomycètes sur les champignons peuvent provenir de la production directe d'un antibiotique ou d'un enzyme dégradant la paroi de champignon (**Baker et Cook, 1974**) ou de la production de substances volatiles inhibant les champignons (**Gupta et Cook, 1974**). Ces réactions ne peuvent pas être attribuées à la compétition nutritive, car les actinomycètes ont généralement un très faible pouvoir compétitif (**Baker et Cook, 1974**).



1 :Pro2, 2 : Pro3, 3 :Pro4, 4 : Pro5, 5 : Pro6, 6 : SF10, 7 :CT5, 8 : Lac1, 9: SFKH1, 10: SFKH3, 11: SFKH4, 12:SFKH5, 13:SFKH6, 14:SFKH7,15:SFKH8, 16:SFKH9, 17:SFKH10, 18:SFKH11.

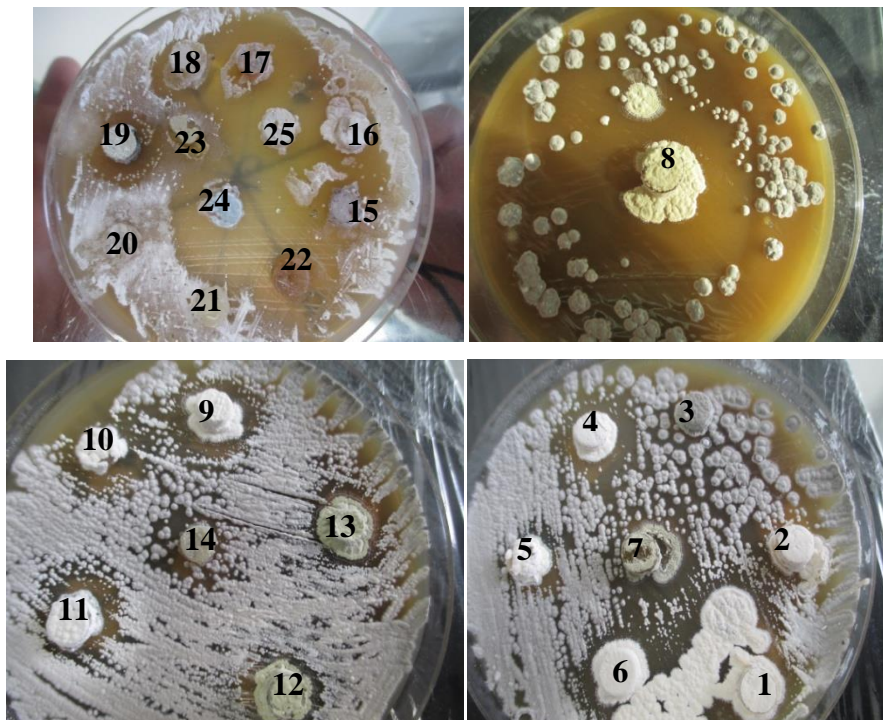
Figure 11 : Quelques photos prises de l'activité antifongiques des actinomycétales testes

### 3. Activité anti *Streptomyces scabies*

*S. scabies* une bactérie Gram positif, qui fait partie des actinomycètes. C'est l'agent causal de la gale commune de la pomme de terre. Elle a la capacité à sécréter des enzymes hydrolysant et la production des toxines provoquant la perte de la pomme de terre.

L'activité anti-scabies des 25 souches actinomycètes testés ont été cultivées sur le milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub> jusqu'à une bonne sporulation, par la suite sont testées par leur effet inhibitrice contre de la bactérie phytopathogènes *S. scabies*. La mise en évidence a été réalisée par la technique des cylindres d'agar (Figure 12, tableau 7).

Selon le tableau nous indique clairement que les souches actinomycètes suivants : SFKH4, SFKH9, CT8, SFKH10, SFKH11 présentent une importante activité contre *Streptomyces scabies* dont le diamètre des zones d'inhibitions respectivement : 28mm, 28mm, 35mm, 28mm. Cependant, les souches : Pro4, SFKH7, SFKH8 ne montre aucune activité vis-à-vis *S. scabies*. La souche Lac1 présente une meilleure activité contre *S. scabies* avec un diamètre de zone d'inhibition est 38mm.



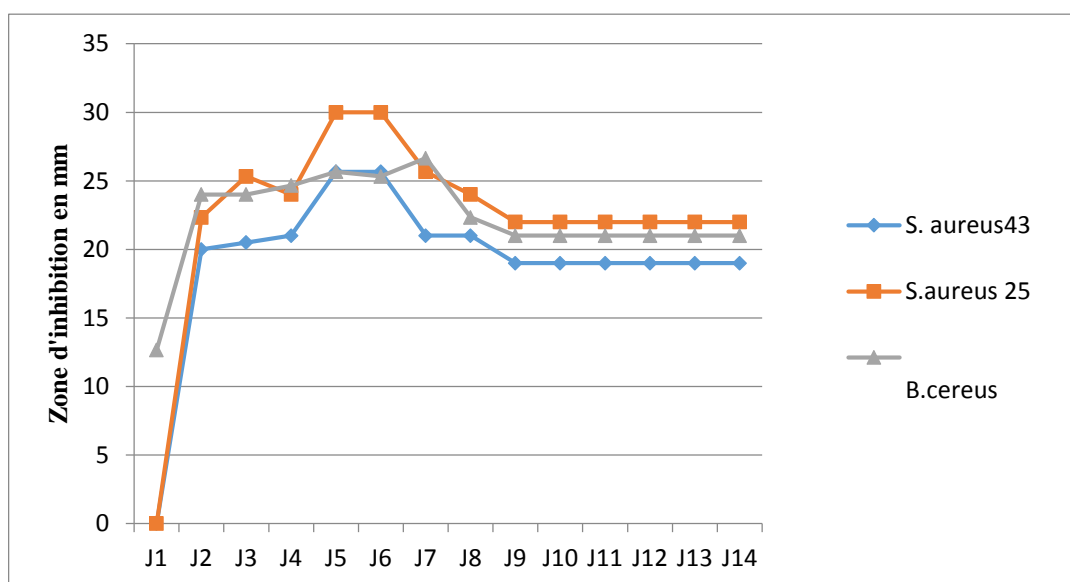
1 : Pro2, 2 : Pro3, 3 : Pro4, 4 : Pro5, 5 : Pro6, 6 : SF10, 7 : CT5, 8 : Lac1, 9 : SF1, 10 : SF2, 11 : SF11, 12 : CT1, 13 : CT6, 14 : Pro1, 15 : SFKH1, 16 : SFKH3, 17 : SFKH4, 18 : SFKH5, 19 : SFKH6, 20 : SFKH7, 21 : SFKH8, 22 : SFKH9, 23 : CT8, 24 : SFKH10, 25 : SFKH11.

Figure N° 12 : Activité anti *Streptomyces scabies* des souches actinomycétales.

## II. Cinétique de production de molécules bioactives

Parmi les 25 souches d'actinomycètes étudiées et d'après la diversité de bactéries cliniques et souches fongiques phytopathogènes envers les quelles sont actives, la souche Lactuca est sélectionnée comme les plus productrices de molécules bioactifs.

L'activité antibactérienne de la souche lactuca vis-à-vis les souches hautement sensibles : *Bacillus cereus*, *S. aureus* 25 et *S. aureus* 43. D'après a courbe de la cinétique on peu constater que l'activité antibactérienne apparait dès le premier jour d'incubation, elle atteint son maximum au 7<sup>ème</sup> jour contre *Bacillus cereus*. Alors que, son activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches de Staphylococcus bactéries débute au 2<sup>ème</sup> jour qui augmente pour atteindre une valeur maximale au 6<sup>ème</sup>. Puis, la valeur reste constante jusqu'à 14<sup>ème</sup> jour pour les trois bactéries tests (**figure N°13**).



**Figure 13 : Cinétique de production de molécules bioactives par la souche sélectionnée lactuca**

La synthèse des molécules antibactériennes par notre souche sélectionné se fait très rapidement probablement parce que les cellules possèdent les enzymes et/ou les précurseurs nécessaires pour leur synthèse ou les produisent rapidement (en moins de 24 heures), c'est au cours de cette période que les actinomycètes procèdent a la synthèse d'enzymes et/ou précurseurs nécessaires (**Dumenil et Sanglier, 1989**). Selon **Aouiche et al (2012)** montrent que les activités deviennent maximales dès le cinquième ou le sixième jour, c'est-à-dire à la

fin de la phase exponentielle et au début de la phase de déclin et restent persistantes jusqu'à la fin de l'incubation. Cela indique que ces activités sont dues à des métabolites secondaires.

### III. Test d'activité des extraits organique de l'antibiotique : Comparaison entre milieu solide et liquide

Une fois l'activité antimicrobiennes a été confirmée, la recherche s'est érigée vers l'extraction des substances bioactives produise par la souche sélectionnée (lactuca ) à partir de deux types de milieux (solide et liquide) afin de choisir le meilleur milieu qui nous donne une meilleur production de molécules bioactives.

Les deux solvants organiques, acétate d'éthyle et acétone, ont été utilisés pour l'extraction à partir un milieu solide et liquide respectivement (choisir après des assai). Le test d'activité a été réalisé par la technique des disques en papier de 6mm de diamètre en raison de 100µl pour les deux extraits d'antibiotiques. Les résultats sont représentés dans le tableau 8 et figure 15. Selon le tableau, l'extrait acétate d'éthyle a donné une meilleure activité vis-à-vis des souches testées en comparant avec l'extrait acétone qui correspond le milieu liquide.

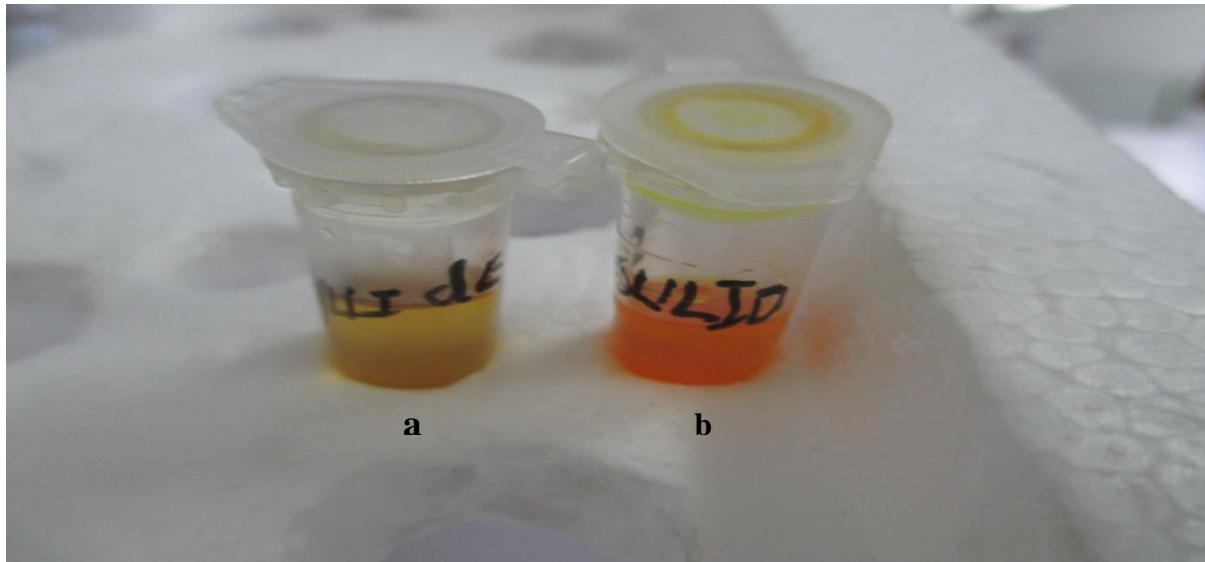


Figure 14 : Extrait acétonique de milieu liquide (a) et acétatique de milieu solide

**Tableau 8: Activité antibactériennes en mm des extraits organiques (acétate d'éthyle et acétone) de la souche lactuca vis-à-vis des bactéries tests.**

Les souches tests	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923
Extrait d'Acétate d'éthyle	40	45	40
Extrait d'acétone	26	24	30

Plusieurs chercheurs ont utilisés les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Actinomycètes*. (**Shomura et al, 1979**). démontrent que l'extraction à partir d'un milieu solide est largement plus rentable que celle à partir d'un milieu liquide. Et comme les solvants organiques de polarité différente ont été largement utilisés pour l'extraction de composés antimicrobien **Selvameen al et al. (2009)**, on a adopté ce type d'extraction avec de l'acétate d'éthyle.

En effet, l'étape d'extraction permet de concentrer les molécules bioactives et est considérée comme une première purification **Chaubal et al. (1995)** ; **Burianek et Yousef (2000)**. Ainsi un disque contenant des molécules pré-purifiées est supposé donner des valeurs de diamètres d'inhibition plus nettes que celles données par un cylindre d'Agar.

Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces* fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin, 1999**), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* comme **Bussari et al. (2008)**.

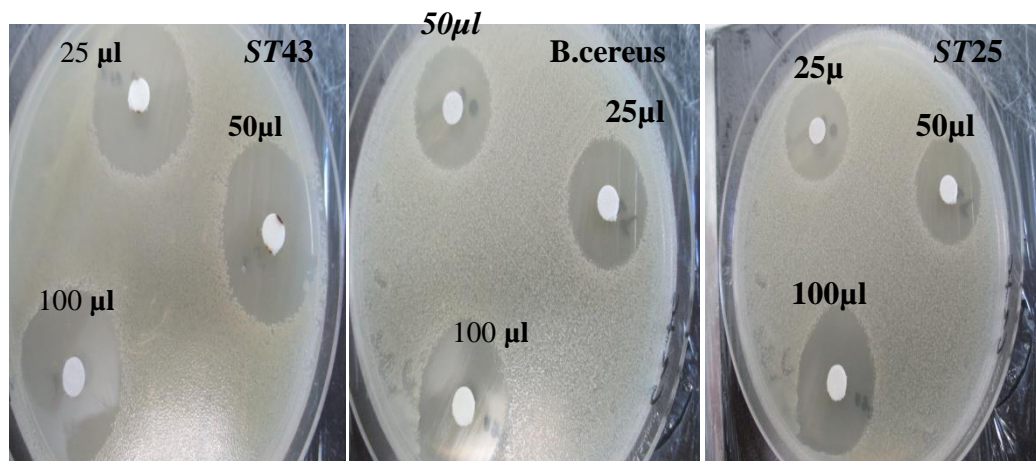
#### IV. Effet du volume de l'extrait d'antibiotique, obtenu à partir du milieu solide, sur l'activité antimicrobienne

A partir des résultats dans le **tableau 9** au dessous, il est très clair que les zones d'inhibitions des trois volumes testés contre les bactéries suivantes : *S. aureus* 43, *Bacillus cereus*, *S. aureus* sont très différents. Le volume 25µl imprégnant le disque en papier donne une zone d'inhibition faible en comparant avec ceux de 50 et 100 µl.

**Tableau 9: Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle (technique de disque)**

Les souches tests (Diamètre en mm)	25µl	50µl	100µl
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	34	31	30
<i>Bacillus cereus</i>	43	39	31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	40	36	32

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.



**Figure 16 : Test de l'effet antibactérien de l'extrait lactuca (100µl, 50µl, 25µl).**

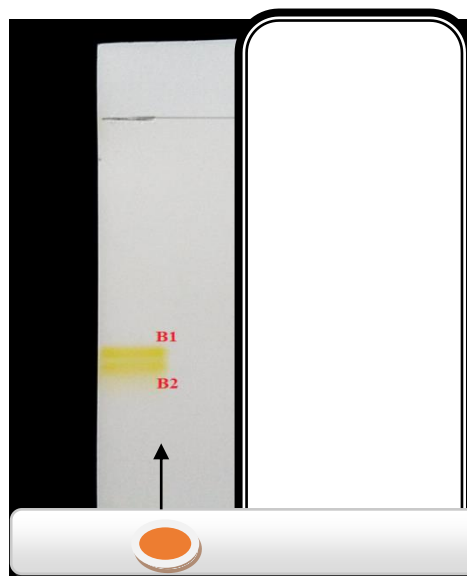
### V. CCM analytique unidimensionnel

La chromatographie sur couche mince (CCM) en gel de silice permettant la séparation des molécules bioactives dans le système de solvant : Toléane, acétone, éther de pétrole. Pour cela une tentative de séparation des molécules bioactives a été réalisée. Le développement des chromatogrammes dans le système éluant saturé fait apparaître deux taches (B1 et B2) dont les rapports frontaux sont calculés et sont réunis dans le (tableau 10).

**Tableau 10 : Biautographie du chromatogramme de lactuca**

Extrait	Rapport frontal (Rf)	Gram positif			
		Zone d'inhibition			
		<i>Bacillus aureus</i>	<i>S aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
acétatique de la souche lactuca	<b>B2</b>	0,38	17	18	26
	<b>B1</b>	0,42	18	20	26

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm



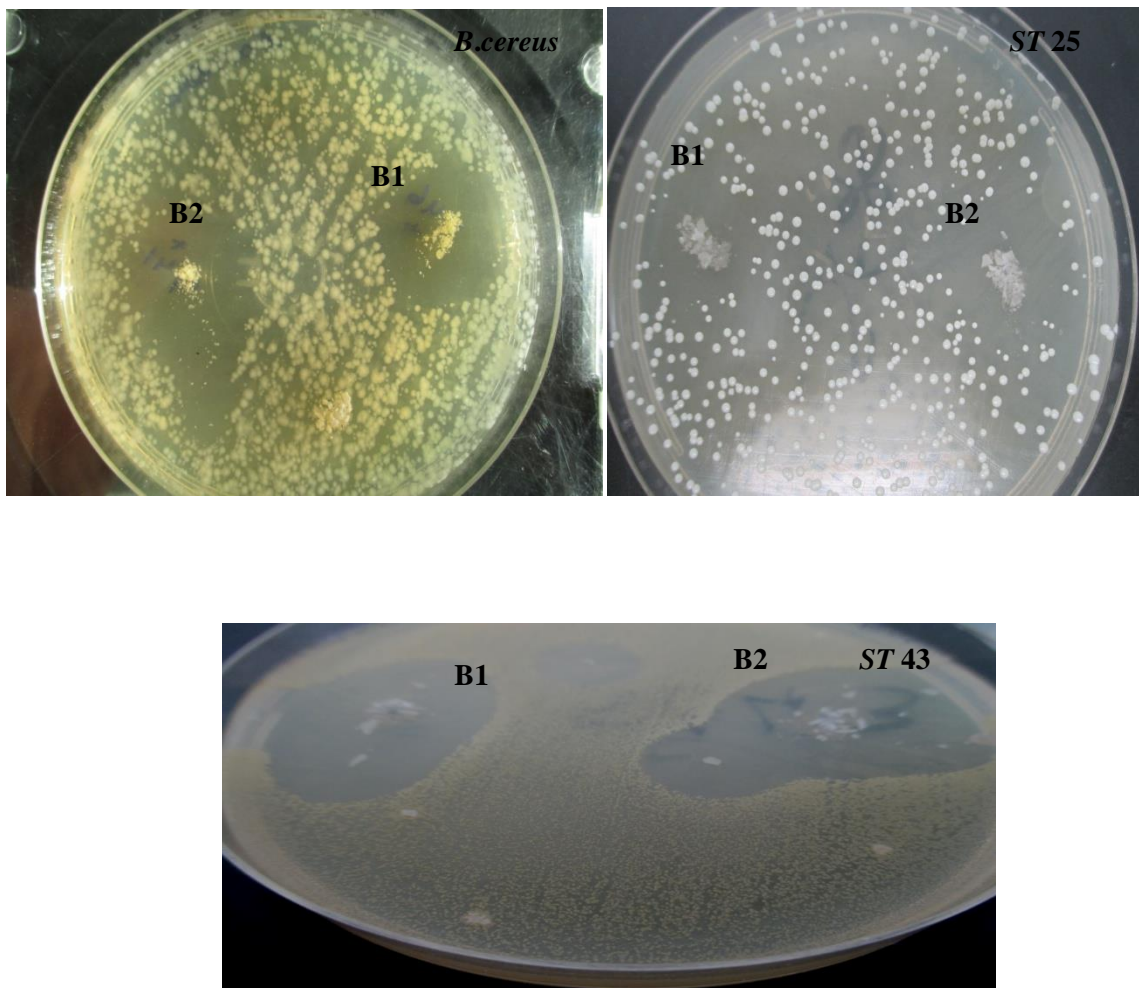
**Figure 17 : Chromatographie sur couche mince (CCM) de la souche lactuca**

Cette technique a montré la présence de deux taches de couleur jaune visibles à l'œil nu **figure 11**, son Rf est de 0.38 et 0.42. Ces deux taches sont constituées soit d'une seule molécule ou bien d'un ensemble de molécules. Généralement les *Streptomyces* ont la capacité de produire plusieurs antibiotiques sur le même milieu ou sur des milieux différents.

## VI. La bioautographie

La bio-autographie utilisée dans le but de montrer l'activité antibactérienne des deux taches obtenues par la chromatographie sur couche mince. Cette activité a été réalisée contre *Staphylococcus aureus* ATCC43, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25.

D'après la bioautographie, il révèle clairement l'efficacité des deux taches vis-à-vis des bactéries testées.



**Figure 18:** La bioautographie des taches séparées contre les trois souches tests

**Awai et al.** (2007) ont utilisé, cette technique pour confirmer le potentiel antibactérienne des taches obtenus la plaque de CCM. **Peneka Moncheva et al.** (2002) ; **Muhammad Awais et al** (2007) ; **Xue-Chang Wu.** ; (2007) ont reporté l'importance deux taches de la chromatographie sur couche mince durant l'étude d'antibiotique.

La chromatographie sur c ouche mince la bioautographie étaient menée par plusieurs chercheurs durant leurs études qui portent sur les antibiotiques. **Considine et al.** (1965) ont utilisé cette technique pour déterminer la position des taches actives de CCM.

Tableau 1 : Les différents sites de prélèvement des souches actinomycétales étudiées.

Souches Actinomycètes	Site de prélèvement
1/ Lactuca 1	Sol rhisosphérique de la région de Batna
2/ ProSG2	Lac Guerra Guellif en surface / Oum albouhgi
3/ ProSG3	Lac Guerra Guellif en surface / Oum albouaahgi
4/ ProSG4	Lac Guerra Guellif en surface / Oum albouahgi
5/ProSG5	Lac Guerra Guellif en surface / Oum albouahgi
6/ ProSG6	Lac Guerra Guellif en surface / Oum albouahgi
7/ SF10	Sol forestier, Hamma, Khenchela
8/ CT5	Chat tizougahet en surface / Khenchela
9/ SF1	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
10/SF2	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
11/SF11	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
12/CT1	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
13/CT6	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
14/SFKH1	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
15/SFKH2	Sol forestier rhisosphérique, Hamma / Khenchela
17/SFKH3	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
18/SFKH4	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
19/SFKH5	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
20/SFKH6	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
21/SFKH7	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
22/SFKH8	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
23/SFKH9	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
24/SFKH10	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela
25/SFKH11	Sol forestier rhisosphérique, Hamma / Khenchela
26/Ct8	Sol forestier risosphérique, Hamma / Khenchela

## Les souches étudiées

Vingt six (26) souches actinomycétales ont été criblées afin de sélectionner la souche la plus productrice de substances bioactives. Il s'agit des souches prélevées a des régions très diversifiées (lac salé, sol forestier, sol rhisosphérique), Aimablement fournies par M<sup>elle</sup> LEULMI Nassima maitre assistante classe A / laboratoire de Microbiologie appliquée, Constantine (Tableau N°3).

### I- Mise en évidence de l'activité antimicrobienne

#### I-1-Activité bactérienne

##### 1-1- Préparation des inocula de bactéries-tests

Pour chaque souche, un inoculum est réalisé a partir d'une culture de 24 heures sur Gélose nutritive. La densité cellulaire de chaque suspension est ajustée par dilution dans l'eau physiologique stérile et en comparaison avec la solution 0,5 Mc Ferland (**annexe 02**) de façon à obtenir une concentration finale de  $10^6$ UFC/ml après incorporation dans le milieu Muller-Hinton (**Cavalla et Eberllin, 1994**).

\*L'activité antibactérienne a été testée contre des bactéries suivantes :

. Bactérie à Gram négatif

*Entérobacter sp*

*Morgan sp*

*Proteus sp*

*Providencia sp*

*K.Pneumoniae* ATCC700603

*Escherichia coli* ATCC25922

. Bactérie à Gram positif

*Bacillus cereus*

*Staphylococcus aureus* ATCC25923

*Staphylococcus aureus* ATCC43300

### **I-2-1- Technique des cylindres d'Agar**

Dans cette méthode, les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées à la surface de milieu gélosé différents, coulés en boîtes de Pétri. Après incubation à 28°C pendant sept jours, pour chaque souche étudiée et sur le milieu de culture utilisé, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont prélevés et sont déposés à la surface des milieux ensemencés avec les bactéries-tests (**Voire tableau N°3**). Les bactéries-tests sont ensemencées dans la masse dans 5ml du milieu Mueller- Hinton faiblement gélose. Cette suspension est étalée sur une couche du même milieu gélose (**Tortorano et al., 1979**). Places deux heures à +4°C pour permettre la diffusion des substances actives, les boîtes sont ensuite incubées à +37°C pendant 24 à 48 heures

**Tableau N°2** : Les souches bactériennes utilisées comme testes

<b>Les souches tests</b>	<b>ATCC</b>	<b>Gram</b>	<b>Source</b>
<i>Entérobacter sp</i>	Souche clinique	négatif	CHU, constantine
<i>Morgan</i>	Souche clinique	négatif	CHU, constantine
<i>Proteus</i>	Souche clinique	négatif	CHU, constantine
<i>Providencia</i>	Souche clinique	négatif	CHU, constantine
<i>K.Pneumoniae</i>	700603	négatif	CHU, constantine
<i>Escherichia coli</i>	25922	négatif	CHU, constantine
<i>Staphylococcus aureus</i> 43300	43300	positif	Hôpital lakbira khenchela
<i>Bacillus cereus</i>	Souche clinique	positif	CHU, constantine
<i>Staphylococcus aureus</i>	25923	positif	Hôpital lakbira khenchela

## **I-2-Activité antifongique**

La production de métabolites antifongiques par les souches d'actinomycètes est mise en évidence par la technique des cylindres d'Agar en utilisant le milieu PDA (**annexe 1**).

Les boîtes sont ensuite maintenues à +4°C pendant 2 à 3 heures avant être incubées pour permettre une diffusion des substances antimicrobiennes active dans le milieu de culture (**Hilali, 2006**). L'incubées à 28 °C pendant 1 semaine, et la distance entre l'extrémité des colonies et celle de mycélium fongique est alors mesurée.

\* L'activité antifongique a été recherchée contre les champignons phytopathogènes suivant :

*Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Cylindrosporium*, *Cladosporium*, *Aerobasidium*, *Phytophthora*.

## **I-3-Activité antibactérienne phytopathogènes**

Dans cette méthode, les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées à la surface de milieu YMEA + CaCO<sub>3</sub> (**annexe 1**) coulés en boîtes de Pétri. Après incubation à 28°C pendant sept jours, pour chaque souche étudiée, des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre ont été prélevés à l'aide d'un emporte-pièce (**Tortorano, 1979**).

Les cylindres d'Agar sont déposés à la surface du milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub> préalablement ensemencé en strie serrée avec la bactérie teste *Streptomyces scabies* (agent de la gale commune de la pomme de terre). Les boîtes de Pétri portant les cylindres d'Agar sont placées à +4°C pendant deux heures pour permettre une diffusion des substances bioactives élaborées par les souches contrôles, puis incubées à 28 °C pendant 1 semaine. La zone d'inhibition est mesurée. La zone d'inhibition est mesurée.

## **II- Cinétique de La production des substances antimicrobiennes**

La cinétique de production de substance antimicrobienne par la souche sélectionnée (Lactuca 1) a été suivie sur le milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub> en utilisant la technique de cylindre d'agar. Un cylindre est prélevé quotidiennement du premier au quatorzième jour d'incubation, puis testé contre les bactéries : *Staphylococcus aureus* ATCC 25, *Staphylococcus aureus* ATCC 43, *Bacillus cereus*.

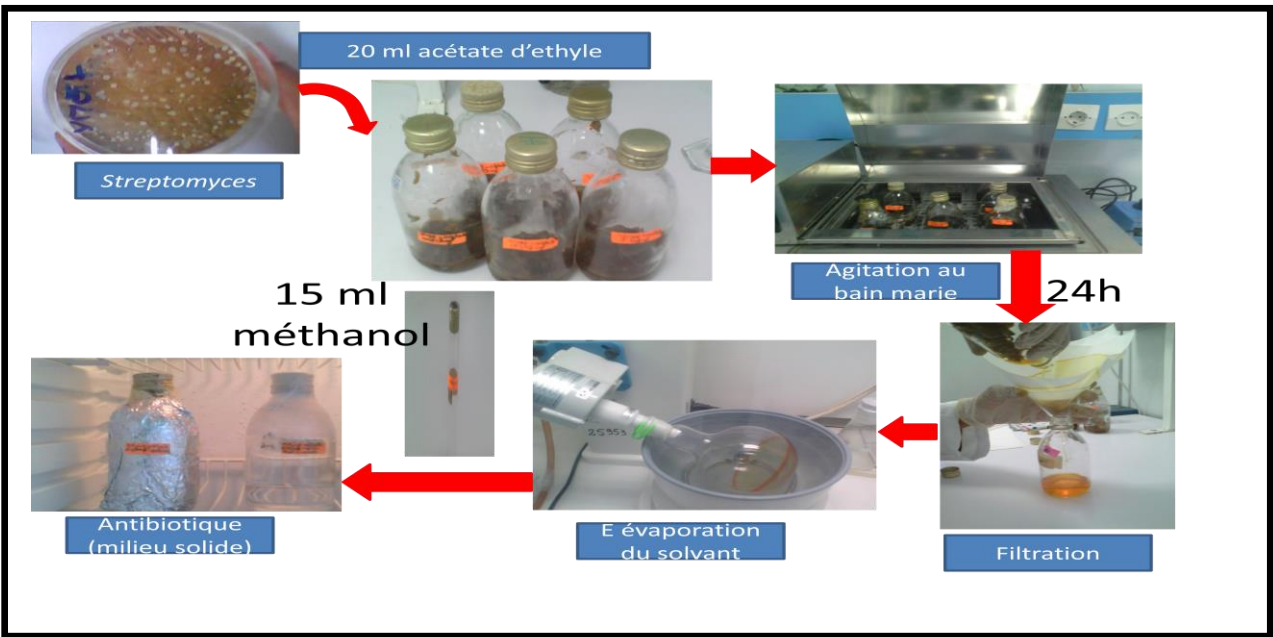


Figure N° 08: Extraction d'antibiotique de l'extrait acétate d'éthyle.

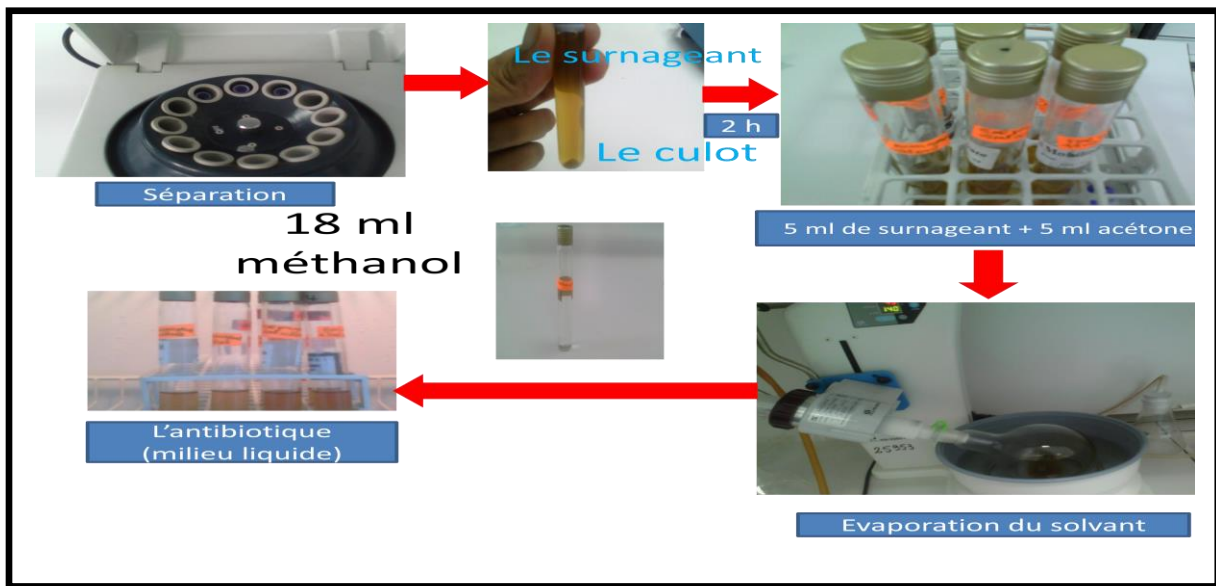


Figure N° 09: Extraction d'antibiotique de l'extrait acétone

### **III- Extraction de la molécule bioactive (antibiotique)**

#### **III-1- Extraction à partir du milieu solide**

Notre souche sélectionné est ensemencée en stries serrées sur milieu YMEA + CaCO<sub>3</sub>. Après, l'incubation à 28°C pendant sept jours. La gélose est fragmentée puis répartie dans cinq flacons contenant chacun 4 ml d'acétate d'éthyle puis ils sont placées dans un bain marie agitateur pendant 24h. Les extraits sont assemblés, filtrés puis évaporés sous vide à 45°C à l'aide d'un rotavapeur (INGOS). Le résidu sec est ensuite dissous dans 15 ml de méthanol (**Figure 1**).

#### **III-2- à partir de milieu liquide :**

##### **Culture en erlenmeyers agites**

La souche d'actinomycète (lactuca 1) est cultivée en erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu YMEA (annexe x). La bactérie est cultivée à 28°C sous agitation 250 rpm pendant sept jours conformément aux résultats de la cinétique de production de molécules bioactive

##### **Préparation de l'extrait organique**

La culture est centrifugée à 11000 g pendant 20 mn dans une centrifugeuse (Sigma3k15). Un volume du surnageant de culture est alors soumis a une extraction avec un volume de l'acétone. Après une agitation pendant 24h au bain marie agitateur, Les extraits sont évaporés sous vide à 45°C à l'aide d'un rotavapeur (INGOS). Le résidu sec est ensuite dissous dans 15 ml de méthanol (**Fig. 1**).

#### **III-3- Test de l'activité antibactérienne des extraits organiques d'antibiotiques**

L'activité antibactérienne de l'extrait acétone (milieu liquide) et de l'extrait acétate d'éthyle (milieu solide) ont été évaluées en utilisant des disques en papier de 6 mm de diamètre stérile. Le disque qui contient 100µl est ensuite déposé sur gélose molle de Mueller-Hinton préalablement ensemencée par écouvillonnage avec les 3 souches tests suivants : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC 25 , *Staphylococcus aureus* ATCC43. Les boîtes sont incubées à 37°C après une pré-diffusion de deux heures à +4°C. La mesure des diamètres d'inhibition est effectuée Après 24 à 48 heures d'incubation.

D'après nos résultats qui montrent que le milieu solide donne une meilleure extraction des substances bioactives, trois volumes différents de l'extrait d'acétate d'éthyle ont été testés par la technique des disques.

### **Test de diffusion sur l'agar**

L'activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle de *Streptomyces* évaluée par la technique de diffusion sur l'agar (méthode de disque).

Des disques de papier Wattman N°3 (5mm de diamètre), stériles, sont chargés respectivement : 25µl, 50µl, 100µl sont déposés sur le milieu Mueller-Hinton préalablementensemencé par écouvillonnage contre trois souches bactériennes (à Gram+ : *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* 25 , *Staphylococcus aureus* 43). Puis laisser à + 4°C pendant deux heures et l'incubation à 37°C pendant 24 heures. Les résultats positifs sont exprimés par l'apparition des zones d'inhibitions.

## **IV-- Séparation des molécules bioactives :**

### **IV-1- Chromatographie sur couche mince :**

Des plaques de gel de silice (60F254) sur support d'aluminium, prêtes à l'emploi, ont été utilisées. 25µl des extraits sont déposés progressivement, à l'aide de capillaire sous forme de spots à 1,5 cm du bord inférieur de la plaque avec séchage entre chaque application. Les cuves rectangulaires utilisées contiennent 100ml de solvants. L'atmosphère des cuves est saturée pendant deux heures avec le vapeur de solvants : Toluène, acétone, éther de pétrole (4:4:3).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant a parcouru une distance de 10 cm à partir du point de dépôt. Après l'élimination du solvant, sont observés sous lumière UV ( $\lambda = 254$  et  $365$  nm) (réaliser au laboratoire de génie microbiologique et applications Constantine 1). Leurs rapports frontaux (Rf) sont calculés d'après la relation :

$$Rf = \frac{\text{Distance parcourue par les molecules bioactives}}{\text{Distance parcourue par le front du solvant}}$$

## **V-2-La bioautographie**

Les spots qui apparaissent sont grattés et déposés à la surface du milieu Muller-Hinton déjàensemencée avec les bactéries tests pour mettre en évidence leur activité antibactérienne. Après pré-diffusion à +4°C et incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

## Résultats et discussions

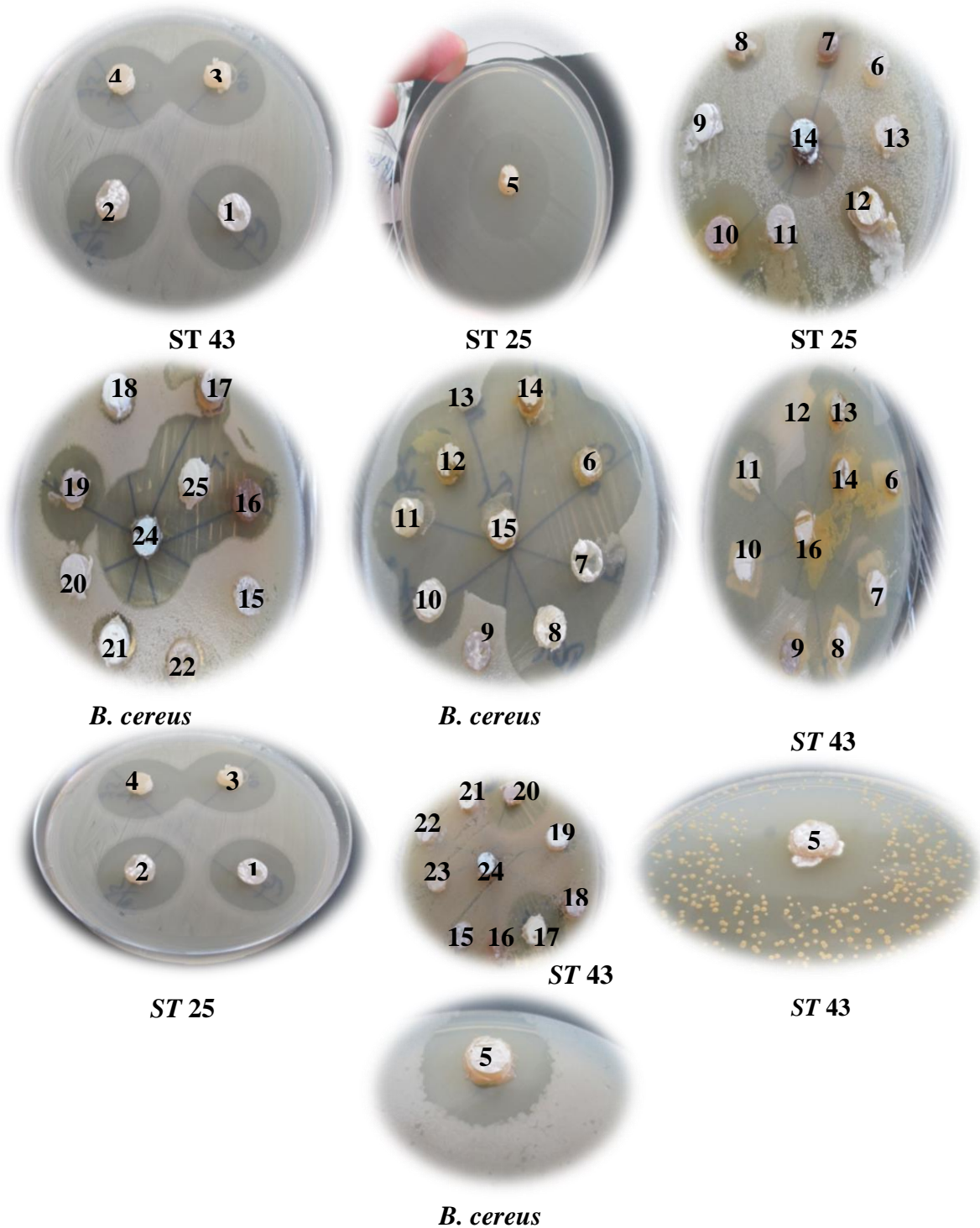
### I. L'activité antimicrobienne des souches d'actinomycétales testées

Un total de Vingt cinq souches d'actinomycètes a été testé. Les isolats obtenus sont repiqués sur milieu YMEA + CaCO<sub>3</sub>, conservés sur YMEA inclinée à +4 °C.

#### 1. L'activité antibactérienne

Les résultats du test d'activité a été bien montre dans le tableau 5 (a, b et c) et les figure 10. En ce qui concerne les germes tests, les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des actinomycètes en comparaison avec les bactéries à Gram négatif. Selon **Taker al.** L'or de la manipulation des nouveaux métabolites secondaires, les actinomycètes sont souvent rencontrés et ils montrent une activité antimicrobienne plus active contre les bactéries Gram positives que des bactéries Gram négatif. Cette différence de sensibilité des deux types bactériens peut être expliquée par la différence morphologique, les Gram négatif possèdent une membrane de nature lipopolysaccharidique qui rend la paroi imperméable aux substances hydrosolubles (polaires). Tandis que les Gram positif plus susceptibles disposent d'une couche externe de peptidoglycane qui n'est gère une barrière imperméable efficace contre ce genre de molécules.

On peut dire aussi que l'activité détecter contre les germes à Gram négatifs est aussi importante vis-à-vis : *Providencia sp*, *Klebseila Pneumoniae*, *Morganilla morgani*. Les trois souches SF1, SF2, SF 10 et SF 11 se révèlent êtres plus actifs sur les souches testes suivantes : *S.aureus*43, *S.aureus* 25et *Bacillus cereus*. (Figure 10). Les actinomycètes ont montrés une activité importante vis-à-vis *Staphylococcus aureus* ce qui a été confirmé avec les travaux de **Devi NKA et al.** (2006) et **Valli S et al** (2012) mais les contredisait lorsqu'il s'agisse de *Pseudomonas aeruginosa* car ils se sont tous avérés inactifs contre cette espèce bactérienne. La souche lactuca 1 enregistre le plus gros diamètre d'inhibition soit 30, 32, 28 mm respectivement contre *Bacillus cereus* et *Staphylococcus aureus* 43 et *S. aureus* 25.



1 :SF1 , 2 : SF2, 3 :SF10, 4 : SF11, 5 : Lac1, 6 : Pro1, 7 :Pro2, 8 : Pro2, 9: Pro3, 10: Pro4,11: Pro5, 12: Pro6, 13: CT1, 14: CT6, 15: CT5, 16: SFKH1, 17: SFKH3, 18: SFKH4, 19:SFKH5, 20:SFKH6, 21:SFKH7, 22:SFKH8, 23: SFKH9, 24:SFKH10, 25:SFKH11.

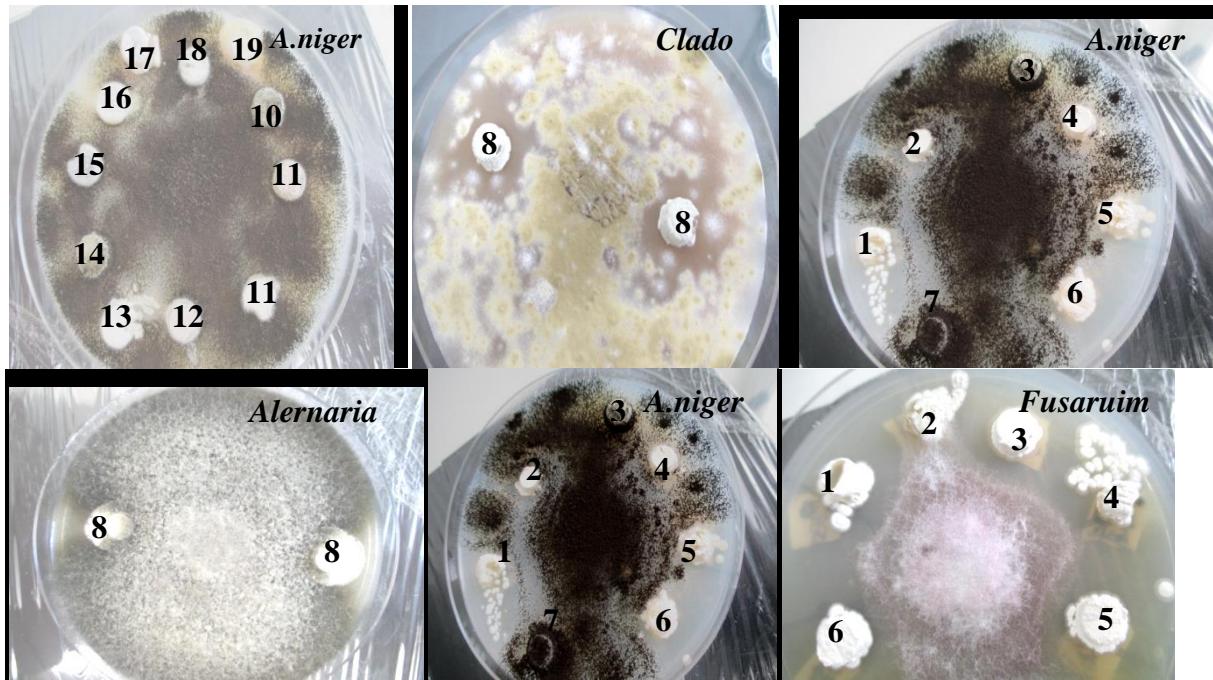
Figure 10 : Quelques photos prises de l'activité antibactériennes des actinomycétales testes

## 2. Activité antifongique

Les résultats de l'antagonisme des isolats d'actinomycètes testés contre les champignons phytopathogènes sont rapportés dans le (tableau 6 et figure 11). Il est bien évident que la croissance des espèces fongiques a été inhibée par les cultures d'actinomycètes, lorsqu'elles sont cultivées conjointement sur milieu PDA. Les isolats provenant de sols rhizosphériques de la région d'Elhamma, présentent une activité antagoniste significative en comparaison avec celles des autres isolats. Les souches actinomycétales SF1, SF2, SF10, SF11, Pro2, Pro3, Pro5, Pro6 apparaissent très active contre tous les champignons tests. Cependant la souche CT5 ne présente aucune activité vis-à-vis les champignons testés.

Les souches : SF1, SF2, SF10, SF11, Pro2, Pro3, Pro4, Pro5, Pro6 manifestants une intense activité contre tous les champignons tests. La souche CT6 sont active contre *Fusarium oxysporum* et *Cladosporium*. Alors que, aucune activité vis-à-vis *Aspergillus niger*. La souche CT1 présente une activité contre *Cylindrosporium* avec un diamètre de 15mm.

Les actinomycètes suivants : CT6, SFKH1, SFKH3, SFKH4, SFKH5, SFKH6, SFKH7, SFKH8, SFKH9, SFKH10 montrent inactif envers *Aspergillus niger* et *Cladosporium*. A partir de ces résultats, on peut conclure que la souche Lac1 a donné des meilleurs résultats par rapport les souches actinomycétales étudiées. En effet, les réactions d'antagonismes qui exercent les actinomycètes sur les champignons peuvent provenir de la production directe d'un antibiotique ou d'un enzyme dégradant la paroi de champignon (Baker et Cook, 1974) ou de la production de substances volatiles inhibant les champignons (Gupta et Cook, 1974). Ces réactions ne peuvent pas être attribuées à la compétition nutritive, car les actinomycètes ont généralement un très faible pouvoir compétitif (Baker et Cook, 1974).



1 :Pro2, 2 : Pro3, 3 :Pro4, 4 : Pro5, 5 : Pro6, 6 : SF10, 7 :CT5, 8 : Lac1, 9: SFKH1, 10: SFKH3, 11: SFKH4, 12:SFKH5, 13:SFKH6, 14:SFKH7,15:SFKH8, 16:SFKH9, 17:SFKH10, 18:SFKH11.

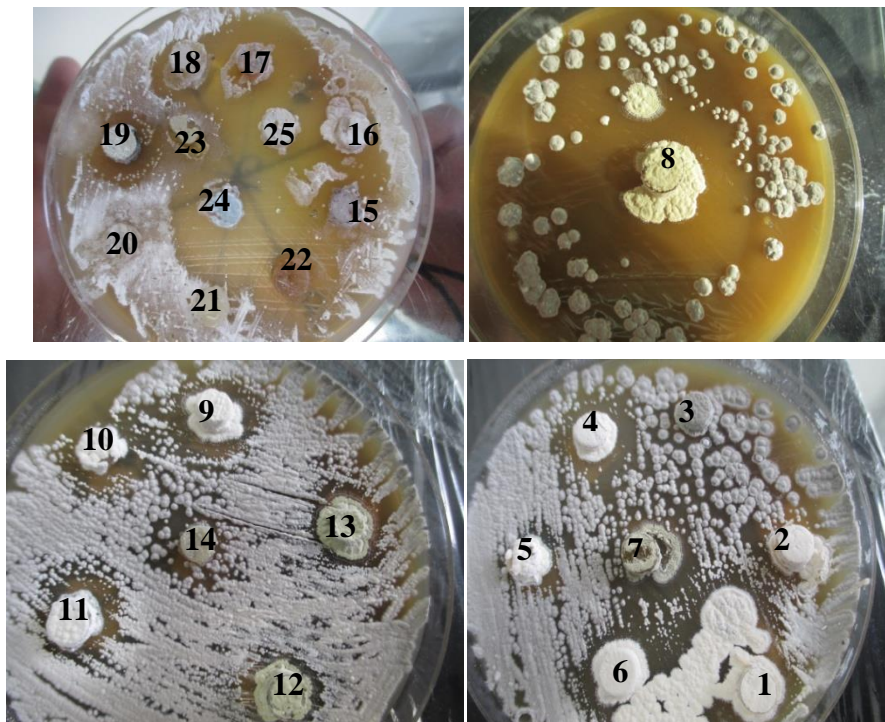
Figure 11 : Quelques photos prises de l'activité antifongiques des actinomycétales testes

### 3. Activité anti *Streptomyces scabies*

*S. scabies* une bactérie Gram positif, qui fait partie des actinomycètes. C'est l'agent causal de la gale commune de la pomme de terre. Elle a la capacité à sécréter des enzymes hydrolysant et la production des toxines provoquant la perte de la pomme de terre.

L'activité anti-scabies des 25 souches actinomycètes testés ont été cultivées sur le milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub> jusqu'à une bonne sporulation, par la suite sont testées par leur effet inhibitrice contre de la bactérie phytopathogènes *S. scabies*. La mise en évidence a été réalisée par la technique des cylindres d'agar (Figure 12, tableau 7).

Selon le tableau nous indique clairement que les souches actinomycètes suivants : SFKH4, SFKH9, CT8, SFKH10, SFKH11 présentent une importante activité contre *Streptomyces scabies* dont le diamètre des zones d'inhibitions respectivement : 28mm, 28mm, 35mm, 28mm. Cependant, les souches : Pro4, SFKH7, SFKH8 ne montre aucune activité vis-à-vis *S. scabies*. La souche Lac1 présente une meilleure activité contre *S. scabies* avec un diamètre de zone d'inhibition est 38mm.



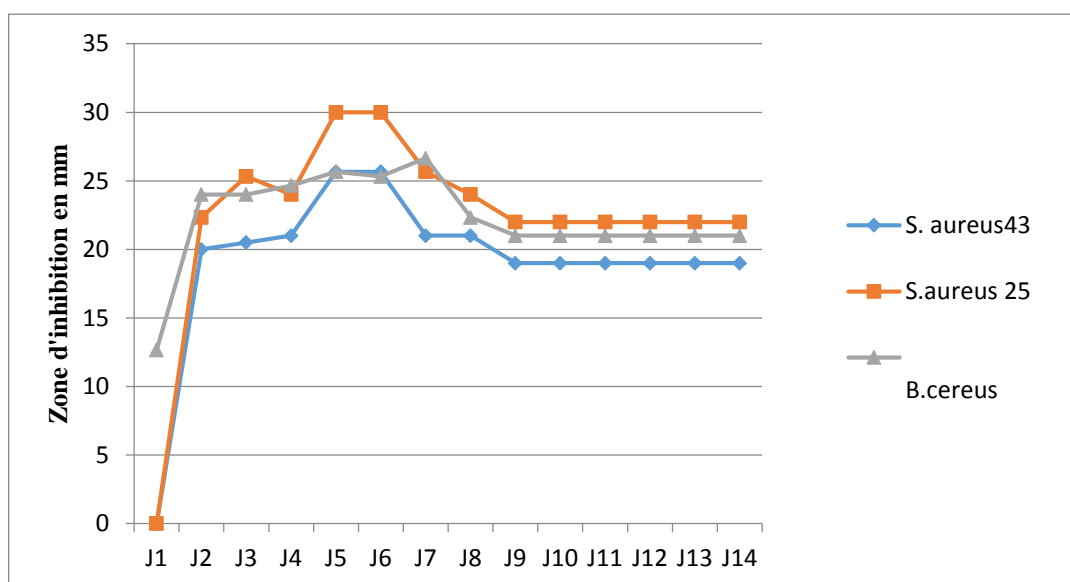
1 : Pro2, 2 : Pro3, 3 : Pro4, 4 : Pro5, 5 : Pro6, 6 : SF10, 7 : CT5, 8 : Lac1, 9 : SF1, 10 : SF2, 11 : SF11, 12 : CT1, 13 : CT6, 14 : Pro1, 15 : SFKH1, 16 : SFKH3, 17 : SFKH4, 18 : SFKH5, 19 : SFKH6, 20 : SFKH7, 21 : SFKH8, 22 : SFKH9, 23 : CT8, 24 : SFKH10, 25 : SFKH11.

Figure N° 12 : Activité anti *Streptomyces scabies* des souches actinomycétales.

## II. Cinétique de production de molécules bioactives

Parmi les 25 souches d'actinomycètes étudiées et d'après la diversité de bactéries cliniques et souches fongiques phytopathogènes envers les quelles sont actives, la souche Lactuca est sélectionnée comme les plus productrices de molécules bioactifs.

L'activité antibactérienne de la souche lactuca vis-à-vis les souches hautement sensibles : *Bacillus cereus*, *S. aureus* 25 et *S. aureus* 43. D'après a courbe de la cinétique on peu constater que l'activité antibactérienne apparait dès le premier jour d'incubation, elle atteint son maximum au 7<sup>ème</sup> jour contre *Bacillus cereus*. Alors que, son activité antibactérienne vis-à-vis les deux souches de *Staphylococcus* bactéries débute au 2<sup>ème</sup> jour qui augmente pour atteindre une valeur maximale au 6<sup>ème</sup>. Puis, la valeur reste constante jusqu'à 14<sup>ème</sup> jour pour les trois bactéries tests (**figure N°13**).



**Figure 13 : Cinétique de production de molécules bioactives par la souche sélectionnée lactuca**

La synthèse des molécules antibactériennes par notre souche sélectionné se fait très rapidement probablement parce que les cellules possèdent les enzymes et/ou les précurseurs nécessaires pour leur synthèse ou les produisent rapidement (en moins de 24 heures), c'est au cours de cette période que les actinomycètes procèdent a la synthèse d'enzymes et/ou précurseurs nécessaires (**Dumenil et Sanglier, 1989**). Selon **Aouiche et al (2012)** montrent que les activités deviennent maximales dès le cinquième ou le sixième jour, c'est-à-dire à la

fin de la phase exponentielle et au début de la phase de déclin et restent persistantes jusqu'à la fin de l'incubation. Cela indique que ces activités sont dues à des métabolites secondaires.

### III. Test d'activité des extraits organique de l'antibiotique : Comparaison entre milieu solide et liquide

Une fois l'activité antimicrobiennes a été confirmée, la recherche s'est érigée vers l'extraction des substances bioactives produise par la souche sélectionnée (lactuca ) à partir de deux types de milieux (solide et liquide) afin de choisir le meilleur milieu qui nous donne une meilleur production de molécules bioactives.

Les deux solvants organiques, acétate d'éthyle et acétone, ont été utilisés pour l'extraction à partir un milieu solide et liquide respectivement (choisir après des assai). Le test d'activité a été réalisé par la technique des disques en papier de 6mm de diamètre en raison de 100µl pour les deux extraits d'antibiotiques. Les résultats sont représentés dans le tableau 8 et figure 15. Selon le tableau, l'extrait acétate d'éthyle a donné une meilleure activité vis-à-vis des souches testées en comparant avec l'extrait acétone qui correspond le milieu liquide.

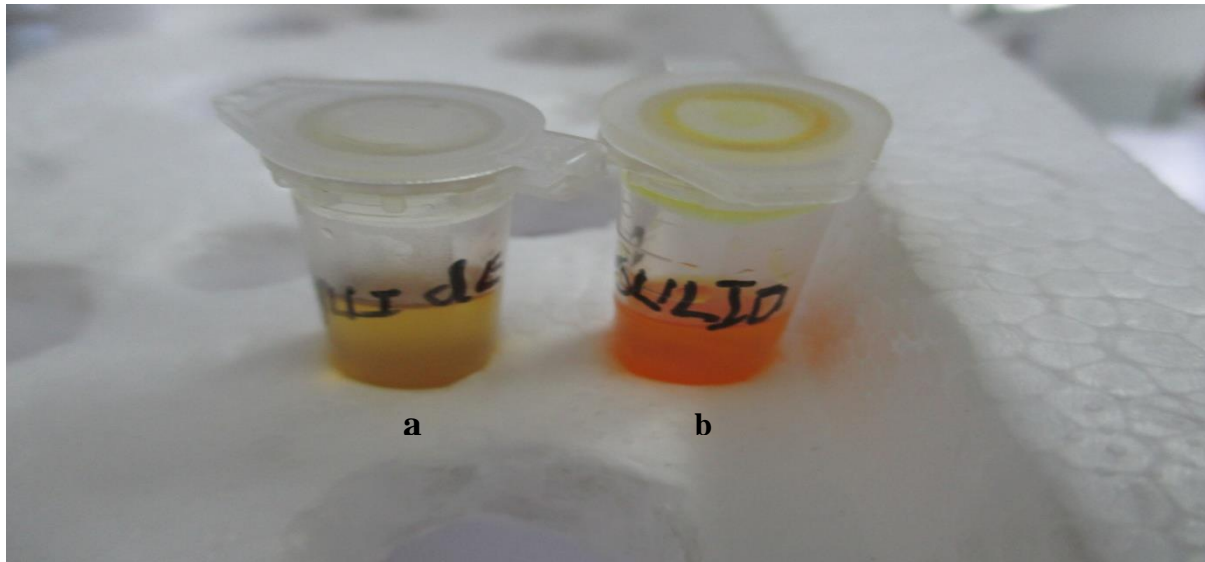


Figure 14 : Extrait acétonique de milieu liquide (a) et acétatique de milieu solide

**Tableau 8: Activité antibactériennes en mm des extraits organiques (acétate d'éthyle et acétone) de la souche lactuca vis-à-vis des bactéries tests.**

Les souches tests	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923
Extrait d'Acétate d'éthyle	40	45	40
Extrait d'acétone	26	24	30

Plusieurs chercheurs ont utilisés les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Actinomycètes*. (**Shomura et al, 1979**). démontrent que l'extraction à partir d'un milieu solide est largement plus rentable que celle à partir d'un milieu liquide. Et comme les solvants organiques de polarité différente ont été largement utilisés pour l'extraction de composés antimicrobien **Selvameen al et al. (2009)**, on a adopté ce type d'extraction avec de l'acétate d'éthyle.

En effet, l'étape d'extraction permet de concentrer les molécules bioactives et est considérée comme une première purification **Chaubal et al. (1995)** ; **Burianek et Yousef (2000)**. Ainsi un disque contenant des molécules pré-purifiées est supposé donner des valeurs de diamètres d'inhibition plus nettes que celles données par un cylindre d'Agar.

Cette différence est due à la morphologie de la croissance dans les deux cas : en milieu liquide, les hyphes des *Streptomyces* fragmentent ce qui diminue leur capacité de produire des antibiotiques (**Stocks et Thomas, 2001**) et généralement la production d'antibiotiques est corrélée avec la taille des fragments mycéliens (**Olson et Ratzkin, 1999**), cette fragmentation en milieu liquide peut être évitée sur milieu solide. Ceci explique les grands diamètres d'inhibition obtenus dans le test de mise en évidence et qui ne sont retrouvés qu'après extraction à partir de milieux solides. D'ailleurs plusieurs chercheurs ont utilisé les milieux solides pour faciliter les différentes étapes d'études de la production d'antibiotiques par les *Streptomyces* comme **Bussari et al. (2008)**.

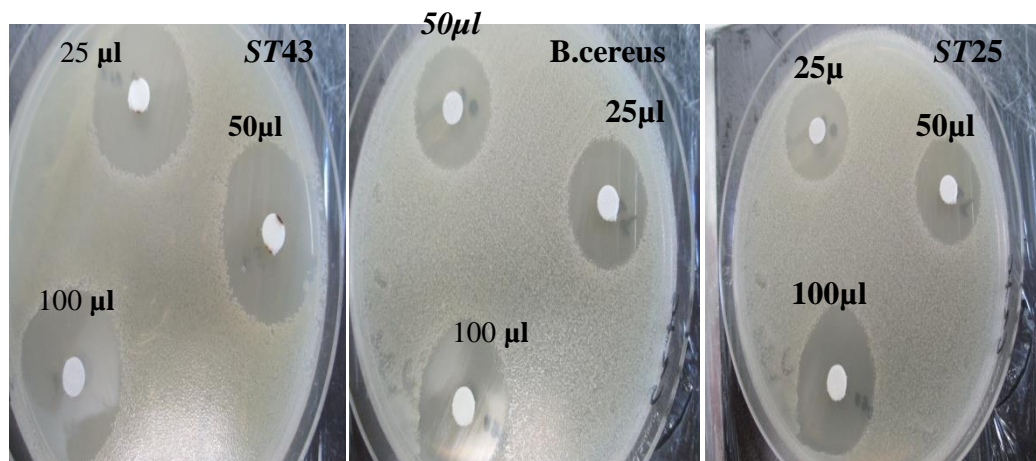
#### IV. Effet du volume de l'extrait d'antibiotique, obtenu à partir du milieu solide, sur l'activité antimicrobienne

A partir des résultats dans le **tableau 9** au dessous, il est très clair que les zones d'inhibitions des trois volumes testés contre les bactéries suivantes : *S. aureus* 43, *Bacillus cereus*, *S. aureus* sont très différents. Le volume 25µl imprégnant le disque en papier donne une zone d'inhibition faible en comparant avec ceux de 50 et 100 µl.

**Tableau 9: Activité antibactérienne de l'extrait acétate d'éthyle (technique de disque)**

Les souches tests (Diamètre en mm)	25µl	50µl	100µl
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC43300	34	31	30
<i>Bacillus cereus</i>	43	39	31
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC25923	40	36	32

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm, (-) aucune activité.



**Figure 16 : Test de l'effet antibactérien de l'extrait lactuca (100µl, 50µl, 25µl).**

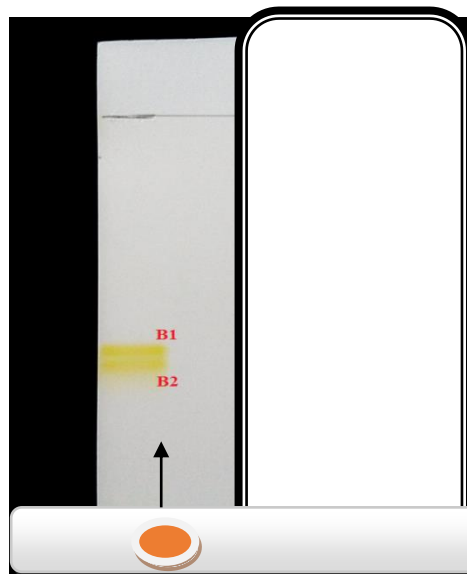
### V. CCM analytique unidimensionnel

La chromatographie sur couche mince (CCM) en gel de silice permettant la séparation des molécules bioactives dans le système de solvant : Toléane, acétone, éther de pétrole. Pour cela une tentative de séparation des molécules bioactives a été réalisée. Le développement des chromatogrammes dans le système éluant saturé fait apparaître deux taches (B1 et B2) dont les rapports frontaux sont calculés et sont réunis dans le (tableau 10).

**Tableau 10 : Biographie du chromatogramme de lactuca**

Extrait	Rapport frontal (Rf)	Gram positif			
		Zone d'inhibition			
		<i>Bacillus aureus</i>	<i>S aureus</i>	<i>S.aureus</i>	
acétatique de la souche lactuca	<b>B2</b>	0,38	17	18	26
	<b>B1</b>	0,42	18	20	26

Diamètres des zones d'inhibitions exprimées en mm



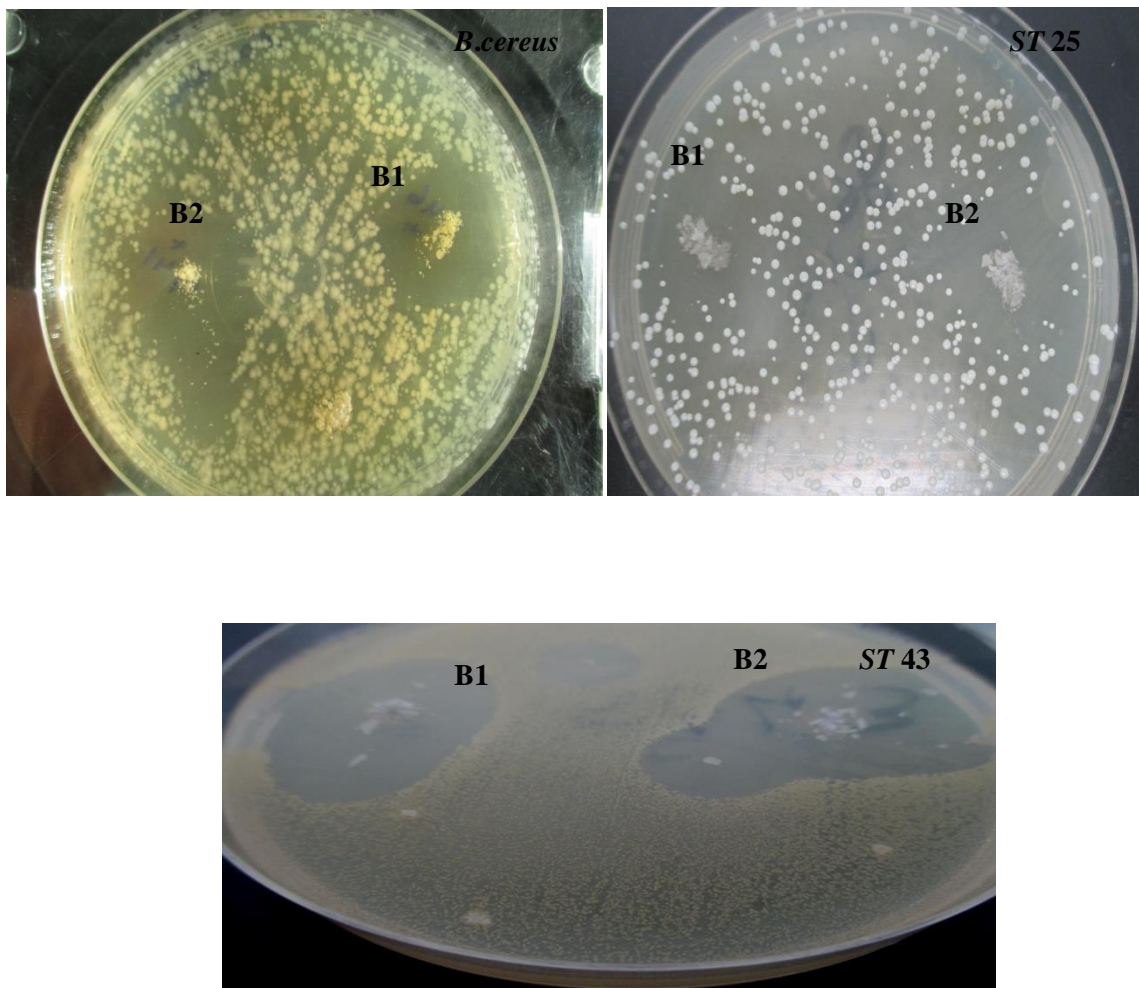
**Figure 17 : Chromatographie sur couche mince (CCM) de la souche lactuca**

Cette technique a montré la présence de deux taches de couleur jaune visibles à l'œil nu **figure 11**, son Rf est de 0.38 et 0.42. Ces deux taches sont constituées soit d'une seule molécule ou bien d'un ensemble de molécules. Généralement les *Streptomyces* ont la capacité de produire plusieurs antibiotiques sur le même milieu ou sur des milieux différents.

## VI. La bioautographie

La bio-autographie utilisée dans le but de montrer l'activité antibactérienne des deux taches obtenues par la chromatographie sur couche mince. Cette activité a été réalisée contre *Staphylococcus aureus* ATCC43, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus* ATCC25.

D'après la bioautographie, il révèle clairement l'efficacité des deux taches vis-à-vis des bactéries testées.



**Figure 18:** La bioautographie des taches séparées contre les trois souches tests

**Awai et al.** (2007) ont utilisé, cette technique pour confirmer le potentiel antibactérienne des taches obtenus la plaque de CCM. **Peneka Moncheva et al.** (2002) ; **Muhammad Awais et al** (2007) ; **Xue-Chang Wu.** ; (2007) ont reporté l'importance deux taches de la chromatographie sur couche mince durant l'étude d'antibiotique.

La chromatographie sur c ouche mince la bioautographie étaient menée par plusieurs chercheurs durant leurs études qui portent sur les antibiotiques. **Considine et al.** (1965) ont utilisé cette technique pour déterminer la position des taches actives de CCM.

# *Résultats et discussion*

*Conclusion  
générale*

Les Actinomycètes sont des sources prometteuses pour la production des métabolites secondaires bioactives. Environ 75% de molécules sont produits par bactéries filamenteuses notamment le genre *Streptomyces*.

Le but principal de ce travail était le criblage d'une collecte des actinomycètes producteurs antibiotiques, suivie de l'extraction des substances bioactives à partir d'une souche à un potentiel de production de molécules bioactives.

L'activité antimicrobienne a été testée contre les deux bactéries à coloration Gram positif et à coloration Gram négatif, les champignons filamenteux et une bactérie actinomycétale responsable de la gale commune de pomme de terre (*S. scabiei*). Ce test est réalisé par la technique de cylindre d'agar. Les résultats obtenus dans la présente étude montrent que :

D'une part, l'activité antimicrobienne diffère d'un isolat actinomycétale à l'autre, et d'autre part, pour le même isolat, l'activité antimicrobienne diffère d'une souche test (bactérie, champignons) à l'autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes et antifongiques en même temps.

La cinétique de production des biomolécules par la souche sélectionnée lactuca montre que cette souche a la capacité de produire les substances bioactives dès le premier jour d'incubation. Cette activité devient importante au sept jour, au delà, il est bien constaté la stabilité de production jusqu'aux 14 jours. En effet, la sécrétion des métabolites secondaires se fait à la fin de la phase exponentielle et le début la phase stationnaire (phase idiophase).

L'extraction de l'antibiotique produit par lactuca à partir de milieu solide et le milieu liquide dont le solvant est différent, nous permet de déterminer que le milieu solide donne une meilleure extraction des biomolécules que le milieu liquide.

Afin de séparer les biomolécules produite par lactuca une chromatographie sur couche mince a été réalisée. Le résultat indique clairement que la souche actinomycétale sélectionné nommé lactuca a la capacité de produire deux molécules très actives sur les bactéries à coloration de Gram positifs.

Au bilan, les résultats indiquent que les actinomycètes ont une activité antibactérienne plus important contre les bactéries à Gram positif. En raison, de leur structure

morphologique. En ce qui concerne l'activité antifongique et l'activité anti-scabies dépend, à la fois, les actinomycètes étudiés et les souches testes.

Nous projetons de compléter à rechercher d'autre souches actinomycètes ont la capacité à synthétiser de l'antibiotique et identifier la structure chimique de ces molécules bioactives par le biais des techniques chromatographies tels que :

- Chromatographie sur papier,
- Chromatographie sur colonne
- Chromatographie en phase gazeuse et HPLC.

*Références  
bibliographiques*

## A

**Aouiche, Adel and Sabaou, Nasserdin and Merklat, Atika and Zitouni , Abdelghani and Mathieu, Florence and Lebrihi, Ahmed.** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. 2012. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 4 : 42-51.

## B

**Bousseboua H.** 2005. Eléments de microbiologie. Publication universitaire Mentouri-Constantine. Algérie. Ch 6 : 155-178.

**Bradford P. A.** 2001. Extended spectrum  $\beta$ -lactamases (ESBL) in the 21<sup>st</sup>. century : Characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. 48: 933-951.

**Bussari B., Saudagar P.S., Shaligram N.S., Survase S.A. et Singhal R.S.** 2008. Production of cephamycin C by *Streptomyces clavuligerus* NT4 using solid-state fermentation. *J Ind Microbiol Biotechnol*. 35:49-58.

## C

**Carle S., Pharm B.** 2003. Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel*. 36 : 25-41.

**Cavalla M., Ebarlin T.,** 1994. Isolement des Streptomycètes du sol. *L'opéron*, 19, 13-17.

**Chaubal M. V., Pyne G. F., Reynolds C.H. et Albright R. L.** 1995 Equilibria for the absorption of antibiotics into neutral polymeric sorbents. *Biotechnol Bioeng*. 47: 215-226.

**Considinet J. M and Mallette M.F.** 1965. Production and partial purification of antibiotic materials formed by *physarum gyrosum*. *App. Microbiol*. 13: 464-468.

**Courvalin P., Philippon A.** 1990. Mécanismes biochimiques de la résistance bactérienne aux agents antibactériens. *In* : Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences. Flammarion. France. Ch 14: 332-355.

## D

**Demain A. L., Dykhuizen L.** 2006. Ecology and industrial microbiologie. Editorial Overview. *Current Opinion in Microbiology*. 9: 237-239.

**Denis Stora.** 2010. Pharmacologie BP, Maladies infectieuses, *Wolters Kluwer* : 54.

**Devi NKA, Jeyarani M, Balakrishnan K.** 2006. Isolation and identification of marine actinomycetes and their potential in microbial activity. *Pak J Biol Sci*. 9(3) : 470-472.

**Devies J. et Mazel D.** 1997. Comment la résistance vient aux bactéries. *Biofutur*. 170: 14-17.

Doi. Y., Arakawa. Y. 2007. 16S ribosomal rRNA methylation: emerging resistance mechanism against aminoglycosides. *Clinical Infection Diseases*. 45: 88-94.

## F

**Fukunagak K., Misatoto T., Asakawa M. Blastocidin**, A new Anti-Phytopathogenic Fungal Substance. Part I. *Bulletin of the agricultural Chemical Society of Japan*. 19: 181-188.

## G

**Gazengel Jean-Marie et Anne-Marie Orecchion.** 2013. La préparation en pharmacie-Guide de théorie et pratique, *Lavoisier* : 1338.

## H

**Haffas M.** 2009. Synthèse et application de phosphinoyl des pénicillines ; et étude de leur activité biologique. Thèse de magister. Université Kasdi Merbah-Orghla. Faculté des sciences et de la technologie et science de la matière.

**Hilali L.,** 2006. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. Production, extraction,

purification de métabolite active et étude taxonomique. Thèse de doctorat : Université Hassa II- Faculté des sciences (Maroc).

**Hiramatsua K., Hanaki H., Ino T., Yabuta K., Oguri T. et Tenover F.C.** 1997 Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduce vancomycin succetbibility. *J Antimicrob Chemother.* 40 :135-46.

**Horinouchie S.** 2002. Antimicrobial hormones, A-factor, as a master switch for morphological differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Frontier in biosciences.* 7: 2045-2057.

**Hwang B. K., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S.** 2001. Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of phnylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 3739-3745.

### *I*

**Inoue O. O., Netto W.S. Padilla G., Facciotti M.C.R.** 2007. Carbon catabolite repression of retamycin production by *Streptomyces olindensis* ICB20. *Brazilian Journal of Microbiology* 38: 58-61.

### *J*

**Jayaraman R.** 2009. Antibiotic resistance: an overview of mechanisms and paradigm:shift *Current Science.* 96: 1475-1482.

**Jinenez J. T., Sturdikova M., Sturdik E.** 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer drugs. *Acta chimica Slovaca.* 2:63-74.

### *K*

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

*L*

**Lacey J.** 1997. Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med.* 4: 113-121.

**Lakshmipathy D. T. et Kannabiran K.** 2009. Amorphological, biochemical and biological studies of halophilic *Streptomyces* sp. Isolated from Saltpan environment. *Am J Infect Dis.* 5 (3): 207-213.

**Lechevalier M. P., Lechevalier H.** 1981. Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. *The Benjamin Cumming Publishing Company, INC.* pp. 315-360.

**Liu S., Liu S.Y., Lu Z.X.** 2007. Antibacterial activity and property of the fermentation product of marine *Streptomyces* sp GB-2. *Chinese journal of biotechnology.* 23: 1077-1081.

**Livermore D.M.** 2004. The need for new antibiotics. *Clinical Microbiol Infect.* 10(4): 1-9.

**Lozniewski A., Rabaud C.** 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prevention du risqué infectieux. Centre de Coordination de litte contre les infections Nosocomial-Sud Est.

*M*

**Madigan M.T., Martinko J.M.** 2007. Biologie des microorganisms. *Printice Hall Internation Inc, New York:* 146-147.

**Mariat F., Sebald M.** 1990. Actinomycétales. In: Le Minor. L., Véron M. Bactériologie médicale. Medecine-Sciences.Flammation. France. Deuxième partie : 933-999.

**Mesbah S.** 2009. Sur le front des emergences. *Medecine Tropicale.* 69:27-32.

**Mukai A., Fukai T., Matsumo Y., Ishakawa J., Hoshino Y., Yazawa K et al.,** 2006. Tansvalencin Z, a new antimicrobial compound with salicyclic acid residue from *Nocardia transvalensis* IFM 10065. *The Journal of Antibiotics.* 59: 366-9.

**Mukhtar T. A., Koteva K. P., Hugheer D. W., Wright G. D.** 2001. Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism, not hydrolysis. *Biochemistry*. 40: 8877-8886.

### **N**

**Neeno-Eckwall E., Kinnel L., Schottel J.** 2001. Competition and antibiosis in the biological control of potato scab. *Canadian Journal of Microbiology*. 47: 332-340.

**Nanjwad B., Chandrashehara S., GGoudanavar P. S., Shamarez A. M., Manvi F.** 2010. Production of antibiotics from soil isolated actinomycetes and evaluation of their antimicrobial activities. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 9: 373-377.

**Noyal M. J., Belgode N.H., Sujatha S., Devinder M. T., Subhash C. P.** 2010. *Sytreptomycetes* bacteremia in a patient with actinomycotic mycetoma. *Infection Dev Ctries*. 4: 249-252.

### **O**

**Olson E. et Rattzkin B.** 1999. Pharmaceutical biotechnology. *Curr Opin Biotechnol*. 10 : 525-527.

**Omura S., Iwai Y., Takahashi Y., Sadakane N., Nakagawa A., Oiwa H et al.,** 2006. Herbimycin, a new antibiotics produced by a strain of *Streptomyces*. *The Journal of Antibiotics*. 32: 255-261.

### **P**

**Pelmont J.** 2005. Biodégradation et Métabolisme. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences. France.

**Poly M.C., Gerland C., Martin D., Lumeley L. et Denis F.** 1998. First clinical isolate of vancomycin intermediated *Staphylococcus aureus* in Fench hospital. *Lancet*. 351:1212.

**Prescott L.M., Harley J.P. et Klein D.A.** 2007. Microbiologie. *De Boek & Larcier, Bruxelles* : 805-825.

## S

**Saffroy S.** 2006. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France. 150 p.

**Sanasam S. and Ningthoujam D. S.** 2010. Screening of local actinomycetes by isolated in Manipur for anticandidal activity. *Asian Journal of Biotechnology*. 2: 139-145.

**Schmitzer P. R., Graupner R. R., Chapin E.L., Feilds S.C., Gilbert J.R., Gray J.A et al.,** 2000. Ribofuranosyl Adenylosuccinate Synthetase Following Phosphorylation . *Natural Products*. 63 : 777-781.

**Singleton P.** 1994. Bactériologie. *Masson*. France. 23p.

**Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M., et Nida T.** 1979. Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. 1. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot*. 32: 427-435.

**Stackbrandt E., Geobel B. M.** 1994. Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal Systematic of Bacteriology*. 44: 846-9.

**Stocks S.M. et Thomas C.R.** 2001. Viability, strength and fragmentation of *Sacharopolyspora erythrea* in submerged fermentation. *Biotechnology and bioeng.* 75(6): 702-709.

**Sturdikova M., Sturdik E.,** 2009. Natural products of marine origin and their perspectives in the discovery of new anticancer. *Acta Chgmica Slovaca*. 2: 63-74.

**Suganito M., Roderick S. L.** 2002. Crystal structure of Vat D: an acetyl transferase that inactivates streptogramin A group of antibiotics. *Biochemistry*. 41: 2209-2216.

## T

**Tortora G. J., Funk B. R., Case C. L.** 2003. Introduction à la Microbiologie. Edition du Renouveau Pédagogique. France.

**Tortorano A.M., Cabrini E. and Viviani M.A.** 1979. Sensibilité *in vitro* des levures à cinq antibiotiques. Comparaison de deux de deux méthodes C.M.I. en gélose et méthode des disques. *Bull. Soc. Fr. Myc. Med.* 8 : 69-74.

**Theilleux J.** 1993. In : Levreau J.Y., Bouix M.O., Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch 6: 425-481.

## W

**Walsh C., Trauger J., Courvalin P., Davies J.** 2001. Adapté à partir du poster des mechanisms d'action et de la résistance aux antibiotiques. Trends In Microbiology, the Lacent Infectious Diseases, *Current Opinion in Microbiology*, Trends In Molecular Medecin. Vol 8.

**Williamson N.R., Fineran C. P., Leeper F.J., Salmon P.C.** 2006. The biosynthesis and regulation of bacterial prodiginin. *Nature Microbiology Review*. Vol 4.

**Wright G. D.** 2007. The antibiotic resistance: the nexus of chemical and genetic diversity. *Nature Rev. Microbiol.* 5: 175-186.

## X

**Xue-chang Wu., Wei-Feng Chan., Chao-Dong Qian., On Liping Li., and Yan-Ping wen.** 2007. Isolation and identification of newly isolated antagonistic Streptomyces Sp. Strain Ap 19-2 Producing chromomycin. *The J. of Microbiol.* 499-504.

**Y**

**Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N.** 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Medecine de Maghrab*. N° 9.

**Z**

**Zait H., Madani K., Abed-Benamara M., Achir I., Hamrioui B.** 2008. Les mycétomes en Algérie. *Journal de Mycologie Médicale*. **18: 116-122.**

*Revue  
bibliographique*

## Chapitre 1 : Les actinomycètes

### I. Généralités

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses, séptées, ramifiées, à coloration de Gram positive (Nanjwad *et al.*, 2010). 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).

Les 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).

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

### I.2- Classification des actinomycètes

Selon la classification du "Taxonomic Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology", seconde édition 2004) Garrity *et al.* (2004). Le **Phylum *Actinobacteria*** (bactéries à Gram positif et G +C % élevé) est constitué d'une seule classe dénommée également " *Actinobacteria* ". Celle-ci a été décrite par Stackebrandt *et al.* (1997).

#### **I.2.1. La classe " *Actinobacteria* ".**

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. Donc, ils ont décrit une nouvelle classe, qui se définit comme un ensemble de souches présentant plus de 80 % de similitude dans la séquence des ARNr 16S ou de l'ADNr 16S et possédant un résidu adénine à la position 906 et un résidu adénine ou cytosine à la position 955 (à l'exception des sous classes *Rubrobacteridae* et *Spherobacteridae* où l'on trouve un résidu uracile à la position 955).

Cette proposition ne change pas les descriptions courantes des espèces et des genres. En effet, leur classification est 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) Stackebrandt *et al.* (1997).

La classe des *Actinobacteria* est divisée en 5 sous-classes) **figure 3**: (*Acidimicrobidae*, *Rubrobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*).

Chacune de ces sous classes est constituée d'un ou de plusieurs ordres eux-mêmes constitués d'une ou de plusieurs familles. Dans la sous-classe des *Actinobacteridae* l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptomycineae*, *Streptosporangineae*, *Frankineae* et *Glycomycineae*) Stackebrandt *et al.* (1997) Labeda et Kroppenstedt, 2000 ; Stackebrandt *et Schumann*, 2000

### I.1. Caractères morphologiques

Les principaux critères morphologiques correspondent à la présence, l'abondance et la disposition des hyphes du mycélium du substrat ou du mycélium aérien. Ainsi que la présence des spores, leur nombre, leur mobilité, leur forme, leur position sur les hyphes, la présence de sclérotés, de sporanges ou de synnémata.

### I.2. Caractères chimiotaxonomiques

La composition de la paroi cellulaire en acides aminés, glucides et lipides constituent le principal caractère utilisé en chimiotaxonomie.

- **Acides aminés de la paroi**

Les *Streptomyces* et genre apparentés contiennent la forme LL-DAP (acide 2,6-diaminopimélique (contrairement à l'ensemble des autres *Actinomycétales*).

- **Glucides**

Les glucides de la paroi cellulaire permettent une séparation en quatre groupes majeurs. Le spectre de sucres A (arabinose + galactose) est caractéristique des genres *Nocardia* et *Saccharopolyspora*. Le spectre glucidique B (madurose) est présent chez les genres *Actinmadura* et *Streptosporangium*. Les *Streptomyces* et genres apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même pour les genres *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinosespectre D) est caractéristique des *Actinoplanes* et du genre *Micromonospora*.

- **Acides gras**

Les acides gras les plus communs, chez les actinomycètes appartiennent soit au groupe de molécules comportant de 12 à 20 atomes de carbone, soit au groupe des acides mycoliques à 20-90 atomes de carbone. La présence d'acides mycoliques est caractéristique des genres tels que *Nocardia*, *Mycobacterium* et *Rhodococcus*.

- **Les acides nucléiques**

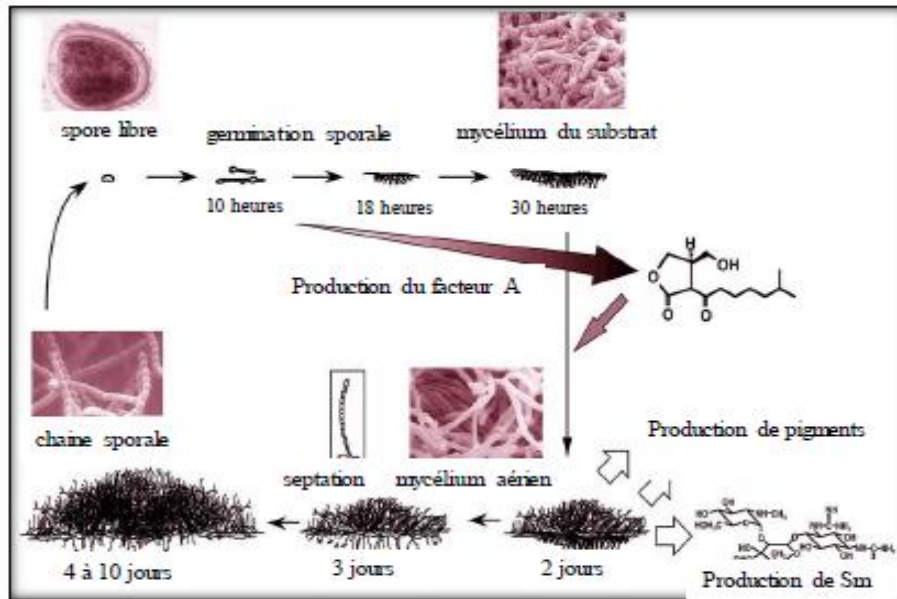
Les déterminations portent sur le pourcentage de guanine et cytosine, sur le spectre obtenu par électrophorèse des fragments de l'ADN (obtenus par la digestion par les enzymes de restriction), sur le taux d'hybridation ADN - ADN ou ADN - ARN et sur la séquence de l'ARNr 16S. Une différence de plus de 10 % indique que deux souches sont sans relation. Au-delà de 70 % de similitude (l'hybridation ADN-ADN), deux souches sont considérées comme appartenant à la même espèce. Le séquençage de l'ARNr 16S, constitue un outil précieux pour déterminer le degré de relation entre souches, espèces et genres) (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985**).

### **II.3. Le cycle de développement des actinomycètes**

Le développement d'une colonie sur milieu solide débute par la germination d'une spore qui conduit à la formation d'un mycélium végétatif constitué d'un enchevêtrement d'hyphes ramifiés, rampants et multigénomiques.

Puis, des hyphes aériens non ramifiés se développent en utilisant comme substrat le mycélium végétatif. Après arrêt de l'extension des hyphes aériens, les filaments se subdivisent pour former des chaînes de spores unigénomiques (**Chater, 1998**).

Il a été estimé qu'environ 60 % des *Streptomyces* produisent, pendant la phase de limitations nutritionnelles, une famille de protéines du type  $\gamma$ -butyrolactone (**Saffroy, 2006**). Ces protéines constituent des intermédiaires entre les modifications du milieu de culture et la synthèse des antibiotiques (**figure N°1**) (**Demain et Dijkhuizen, 2006**).



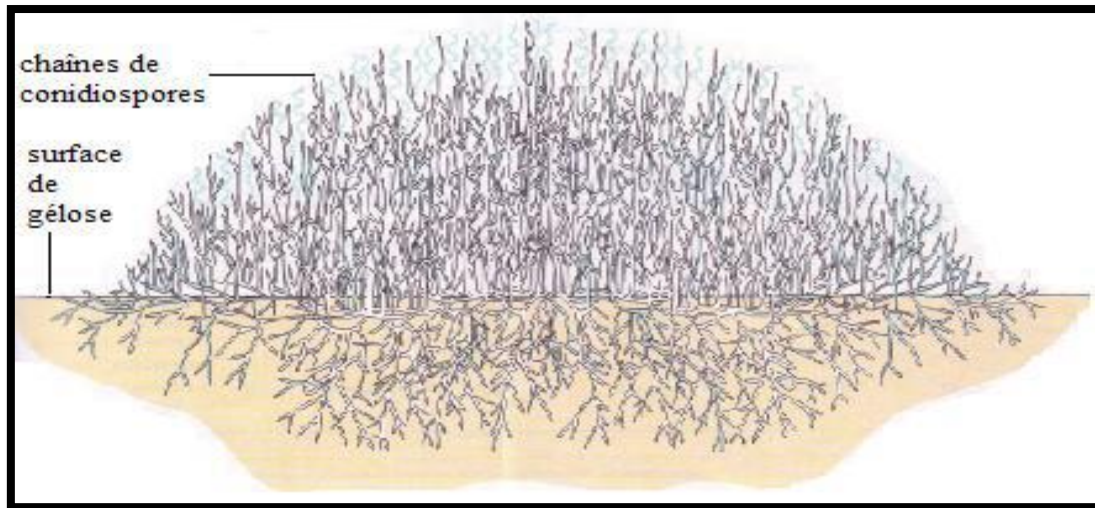
**Figure N°1** : Cycle de développement de *Streptomyces griseus* (Horinouchi, 2002)

#### **I.4. Mycélium du substrat et mycélium aérien des actinomycètes**

Lorsqu'il croît sur un substrat solide comme la gélose, le réseau ramifié d'hyphes formé par les actinomycètes se développe à la fois à la surface du substrat et à l'intérieur de ce dernier pour former un mycélium végétatif (Prescott *et al.*, 2003).

Les sporoactinomycètes produisent un véritable mycélium du substrat, ramifié et non fragmenté. Des parois transversales peuvent être formées pour isoler les parties les plus âgées du mycélium. Des spores sont formées sur le mycélium du substrat chez des genres comme : *Micromonospora*, *Micropolyspora*, et parfois *Streptomyces* (Saffroy, 2006).

Des septums divisent habituellement les hyphes. Parfois, il se forme une masse ressemblant à un tissu qui porte le nom de **thalle**. De nombreux actinomycètes ont également un mycélium aérien qui se dresse au-dessus du substrat et qui forme à l'extrémité des filaments, des spores asexuées à paroi fine appelées **conidies** ou **conidiospores** (figure N°2) (Prescott *et al.*, 2003).



**Figure N°2** : Coupe transversale d'une colonie d'actinomycète avec des hyphes vivants (bleus-verts) et morts (blancs). Le mycélium végétatif et le mycélium aérien avec des chaînes de conidiospores sont représentés (Prescott *et al.*, 2003).

### **I.5. Formation des spores par les actinomycètes**

Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores (Theilleux, 1993), ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Saffroy, 2006).

Beaucoup d'actinomycètes qui forment des hyphes, produisent des exospores par séparation et fragmentation des hyphes, ces spores sont dépourvues de structures spécialisées, mais font néanmoins preuve de résistance notamment vis-à-vis de la chaleur sèche, de la dessiccation, et de certains produits chimiques (Pelmont, 1994).

Les spores de *Streptomyces* sont métaboliquement moins actives que les hyphes végétatifs, bien qu'elles ne soient pas complètement en dormance. Chez les actinomycètes *Actinoplanes* et *Pilimelia*, des zoospores mobiles (pourvues de flagelles) se forment à l'intérieur d'un sac fermé appelé sporange, les endospores sont issues d'une réorganisation cytoplasmique et de la formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe existant (Singleton, 1994), elles sont caractéristiques du genre *Thermoactinomyces* (Pelmont, 1994).

## **I.6. Le matériel génétique des actinomycètes**

Le matériel génétique des actinomycètes est constitué par l'ADN chromosomique ainsi que chez certaines souches par l'ADN plasmidique ou de l'ADN phagique. Un caractère majeur est la proportion élevée environ 70 % de guanine et cytosine (G+C) dans l'ADN de la plupart des actinomycètes (**Theilleux, 1993**).

## **I.7. Distribution des actinomycètes dans la nature et pathogénéité**

Les actinomycètes sont universellement répandus. Ils constituent en général 10 à 20% du total de la microflore tellurique (Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976). Ils sont rencontrés sur une grande variété de substrats naturels: sols, air, fumier, composts, foin, débris végétaux, résidus fibreux de cannes à sucre, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, mers et océans, etc. (**Lacey, 1997**). Ils sont retrouvés également dans les environnements extrêmes tels que les sols glaciaires de l'Arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols pollués par du pétrole ou des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et dans certains milieux très salés (**Lechevalier, 1981**).

Les actinomycètes sont généralement saprophytes, mais quelques-uns sont pathogènes pour les plantes tel *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (**Loria, 1986**).

Dans la distribution naturelle des actinomycètes, il faut ajouter les végétaux, les animaux et l'homme pour lesquels certaines espèces sont pathogènes (**Theilleux, 1993**). Peu de maladies des plantes sont provoquées par les actinomycètes. Notons une gale de pomme de terre causée par *Streptomyces scabiei* (**Neeno-Eckwall et al., 2001**) ou encore, pathogènes pour l'homme, telles les infections causées par certaines espèces de *Nocardia*, de *Nocardiosis*, d'*Actinomyces* ou de *Streptomyces* (**Peltola et al., 2001**).

Les actinomycètes sont importants en raison des maladies humaines et animales que certains provoquent, ils peuvent occasionner certaines tumeurs (mycétomes) chez l'Homme (**Noyal et al., 2010**). Durant les dix années (1995 - 2005), deux cas de mycétomes à *Actinomadura madurae* et à *Streptomyces* ont été observés chez deux patientes originaires de Tamanrasset et d'Ain defla en Algérie (**Zait et al., 2008**).

Certaines Mycobactéries sont la cause de pathologies animales, végétales et surtout humaines, comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la Tuberculose) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) (**Bousseboua, 2005**).

## II. Substances bioactives produites par les actinomycètes

Les actinomycètes représentent une grande proportion de la biomasse microbienne du sol. Ils ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques et d'enzymes extracellulaires.

### 1. Les antibiotiques

Depuis 1940, la fabrication des antibiotiques a pris une part dominante dans l'industrie pharmaceutique, représentant près de 25% de son chiffre d'affaire.

Le tableau N° 1 illustre quelques exemples d'antibiotiques et d'autres molécules bioactives non antibiotiques produites par les actinomycètes.

En ce qui concerne l'activité antifongique des actinomycètes, elle ne se limite pas seulement aux champignons filamenteux mais s'étend aux levures et aux dermatophytes. A titre d'exemple, la souche *Streptomyces mutabilis* présente une activité anticandidale envers *Candida albicans* (Sanasam et Ningthoujam, 2010), et la souche *Streptomyces rochei* présente une activité anti dermatophytique vis-à-vis le dermatophyte *Trichophytum rubrum* (Lakshmipathy et Krishnan, 2009).

Le tableau 1 représentent respectivement la répartition de production d'antibiotiques entre les bactéries et les champignons, et celles des molécules bioactives antibiotiques et non antibiotiques entre les *Streptomyces* et autres genres d'actinomycètes dont la dominance de production est affectée aux bactéries appartenant au genre *Streptomyces*.

### 2. Les extremozymes

Après les antibiotiques, les enzymes sont les plus importants produits des actinomycètes. Ils produisent de nombreuses enzymes dont certaines sont déjà utilisées dans les domaines agro-alimentaire et médical, comme la glucose isomérase, la glucoamylase, les protéases, les cellulases, les ligninases et les cholestérol oxydases (Young et al., 1980). Par ailleurs, les protéases alcalines des actinomycètes sont utilisées dans les détergents pour lessive (Moreira, 2002).

### 3. L'utilisation des actinomycètes comme bio insecticides et bio pesticides

Les actinomycètes sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (Voir tableau N°1).

**Tableau N° 1** : Différentes Substances produites par les actinomycètes

<b>Actinomycètes producteurs</b>	<b>Antibiotiques</b>	<b>Références</b>
<b>1/Les agents antibactériens</b>		
<i>Micromonospora sp.</i>	Clostomycine	<b>Takahashi et al., 2003</b>
<i>Streptomyces griseus</i>	Candicine	<b>Jinenez et al., 2009</b>
<i>Streptomyces lydicus</i>	Streptolydigne	<b>Liuet al., 2007</b>
<i>Streptomyce lindensis</i>	Rétamycine	<b>Inoue et al., 2007</b>
<i>Marinispora sp.</i>	Marinomycine	<b>Sturdikovà et Sturdik, 2009</b>
<i>Verrucosipora sp.</i>	Abyssomycine	<b>Sturdikovà et Sturdik, 2009</b>
<b>2/ Les agents antifongiques</b>		
<i>Streptomyces griseochromogenes</i>	Blasticidine	<b>Fukunaga et al., 2008</b>
<i>Streptomyces humidus</i>	Phenylacétate	<b>Hwang et al., 2001</b>
<i>Nocardia transvalensis</i>	Transvalencine	<b>Mukai et al., 2006</b>
<i>Streptomyces nodosus</i>	Amphotéricine B	<b>Carle et al., 2003</b>
<b>3/Les bioherbicides et bioinsecticides produits par les actinomycètes</b>		
Spinosad. Insecticide neurotoxique	<i>Saccharopolyspora spinosa</i>	<b>Williamson et al., 2006</b>
Herbicides. <b>Exemple 1.</b> 2,4-Dihydro-4-( $\beta$ -Dribofuranosyl)-1, 2, 4 (3H)-triazol-3-one	<i>Actinomadura sp</i>	<b>Schmitzer et al., 2000</b>
<b>Exemple 2.</b> Herbimycine	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	<b>Omura et al., 2006</b>

## Chapitre 2 : Les antibiotiques

### 1. Définition des antibiotiques

Ce sont des substances naturelles produites par des moisissures ou des bactéries ou des composés chimiques, obtenus par synthèse organique, qui inhibent ou détruisent même à très faible concentration, d'autres microorganismes, sans présenter une toxicité pour l'hôte (Gazengel Jean-Marie et Anne-Marie Orecchion, 2013).

### 2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon plusieurs critères : l'origine, la nature chimique, le mécanisme et le spectre d'action (Yala *et al.*, 2001).

La sensibilité des microorganismes aux différents antibiotiques est très diverse, les bactéries à coloration de Gram positive et les bactéries à coloration de Gram négative peuvent avoir un comportement différent vis-à-vis un antibiotique spécifique, alors que certains antibiotiques à large spectre présentent la même efficacité sur ces deux groupes (Madigan *et al.*, 1997).

Théoriquement, les agents antimicrobiens visent la destruction des agents agresseurs en s'attaquant directement à leurs structures essentielles (paroi cellulaire, ribosomes, membrane plasmique, ADN) et/ou en perturbant leurs métabolismes et leurs fonctions (figures N° 3,4, 5, 6) (Tortora *et al.*, 2003).

### 3. Résistance aux antibiotiques

La résistance aux antibiotiques est la faculté que possède une bactérie à pouvoir croître en présence d'un antibiotique (Denis Stora, 2007)

#### ➤ La résistance naturelle

C'est une insensibilité aux antibiotiques, existant naturellement chez tous les membres d'un genre ou d'une espèce bactérienne. Elle fait, partie du patrimoine génétique normal du germe. (Leclere *et al.*, 1995). *Klebsiella spp* produit naturellement des bêta-lactamases, et les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (Lozniewski *et Rabaud*, 2010).

### ➤ La résistance acquise

A côté de la résistance naturelle, existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques, ces nouveaux gènes peuvent être obtenus soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjuguais ou de transposons (Wright, 2007). Les bactéries peuvent devenir résistantes aux antibiotiques via différents mécanismes (figure N°5).

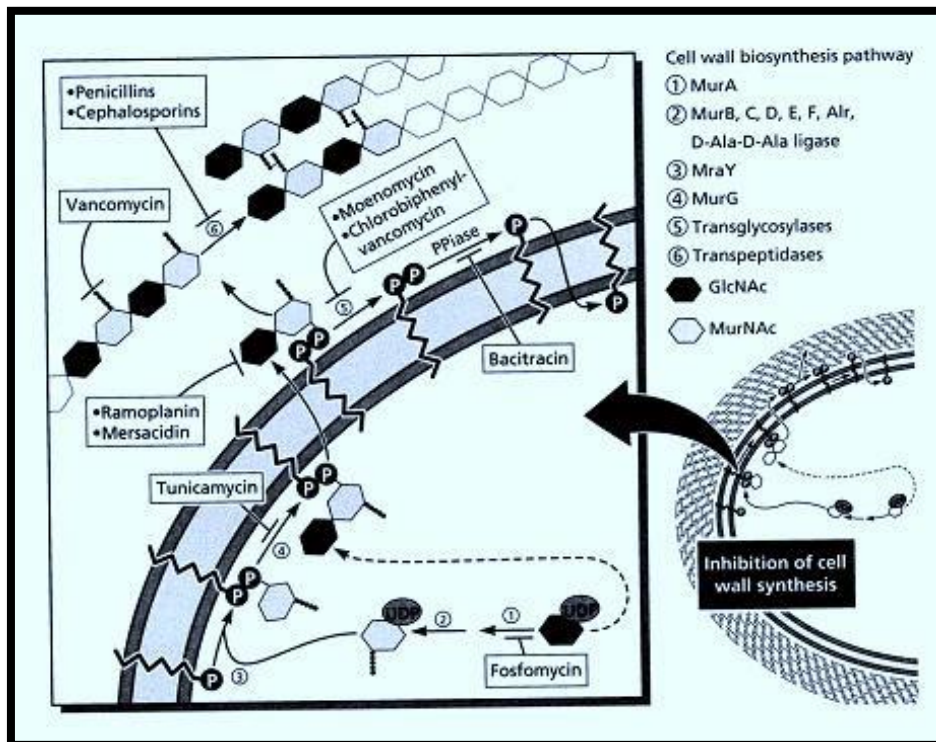


Figure N°3 : Principaux antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane (Walsh *et al.*, 2001)

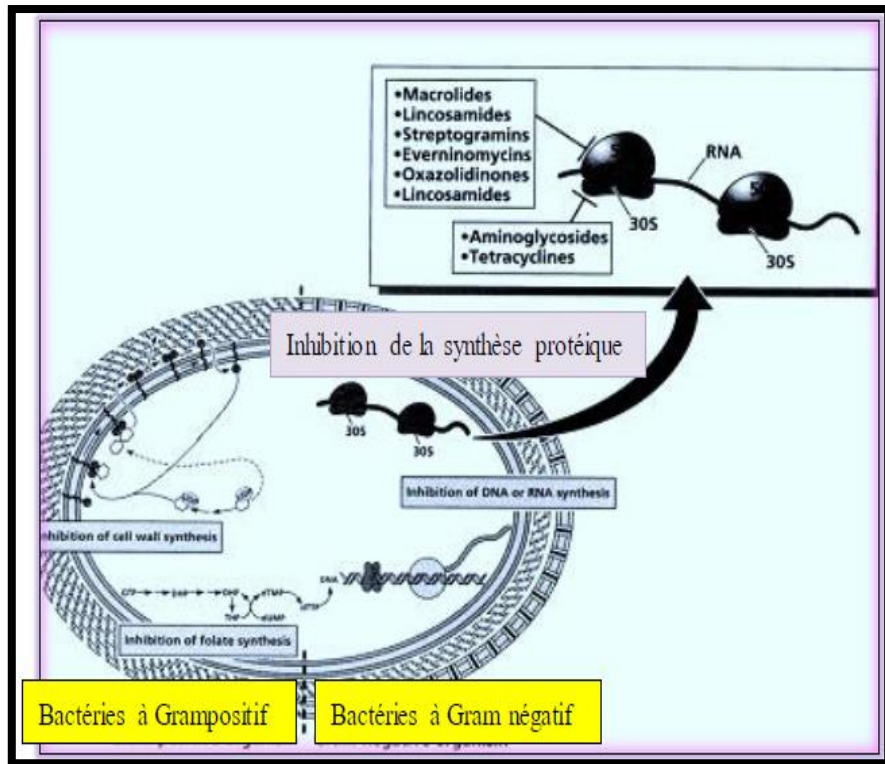


Figure N°04: principaux antibiotiques inhibiteurs de synthèses protéiques (Walsh *et al.*, 2001)

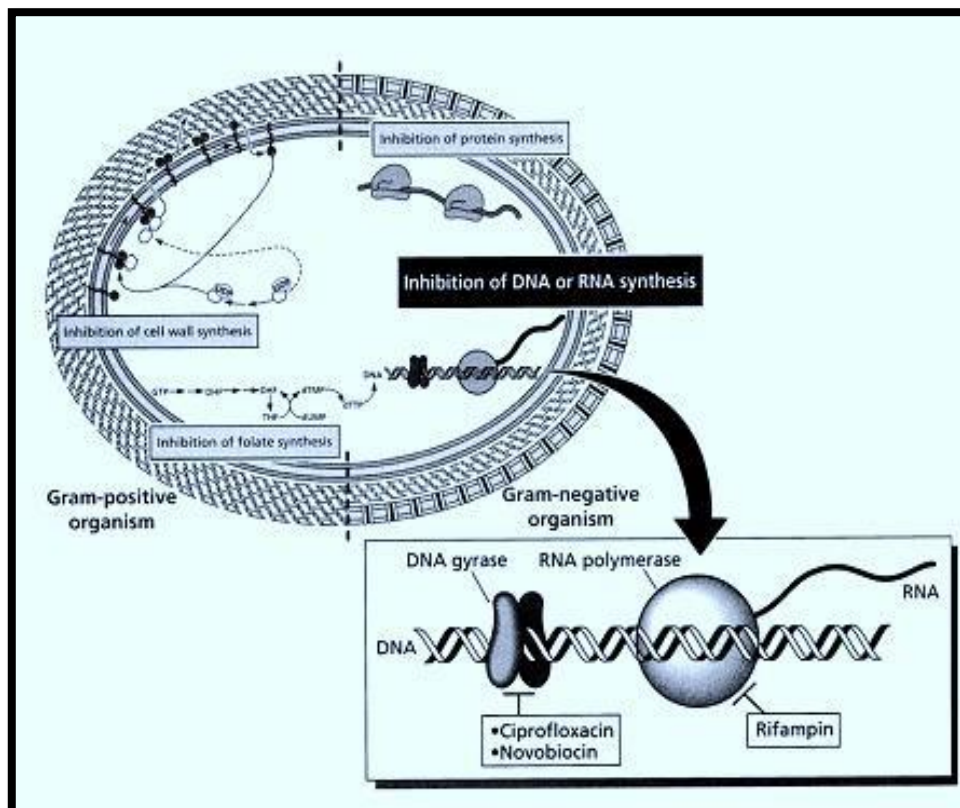
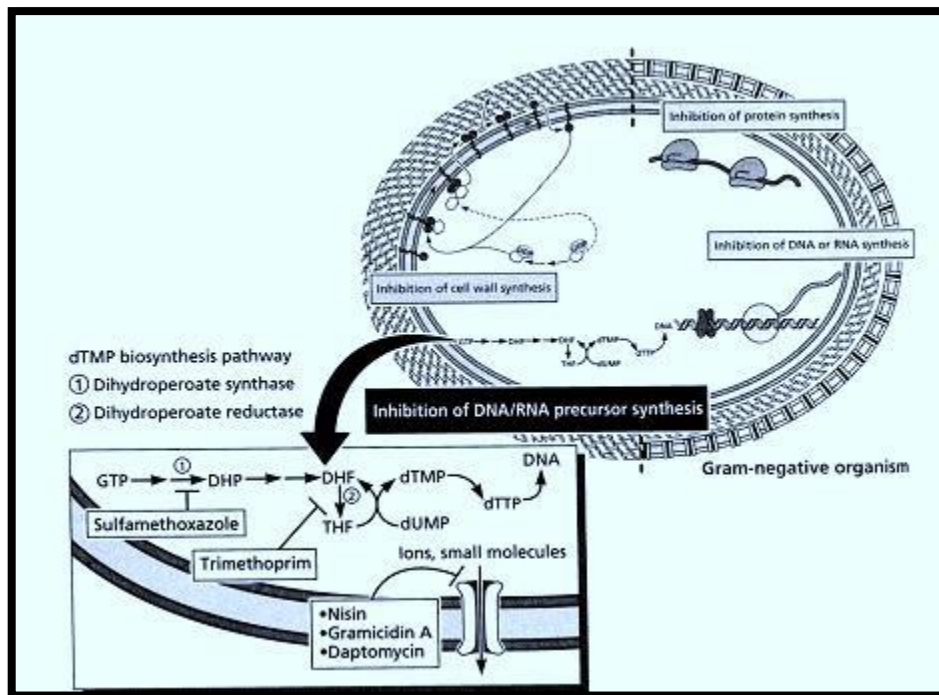


Figure N° 05 : Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Walsh *et al.*, 2001)



**Figure N° 6:** Principaux antibiotiques inhibiteurs de la synthèse des folates (Walsh *et al.*, 2001)

#### **4. Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux agents antibactériens**

Ils peuvent être regroupés en trois grands types de mécanismes : diminution de la perméabilité et efflux actif, modification de la cible des antibiotiques, production d'enzymes inactivant les antibiotiques (Wright, 2007).

- **Diminution de la perméabilité** par mutation affectant la structure des porines ou diminuant leurs synthèse par les quelles l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie (Lozniewski et Rabaud, 2010).
- **Expulsion rapide de l'agent hors de la cellule avant qu'il puisse agir**

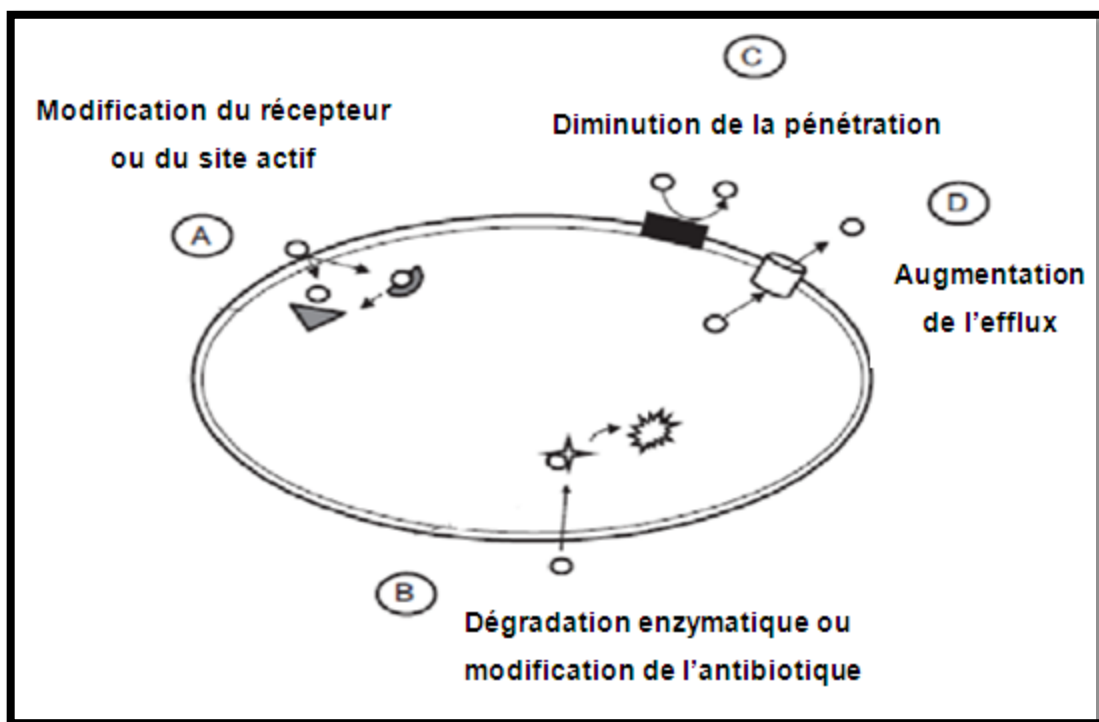
Un certain nombre de bactéries possède une capacité intrinsèque de rejeter hors de la cellule la substance qui vient d'y entrer. Cette propriété est très connue chez les bactéries à Gram négatif (c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*) qui possèdent dans leur membrane des protéines, appelées pompes effluentes, qui expulsent les antibiotiques (Jayaraman, 2009).

➤ **La destruction ou l'inactivation de l'antibiotique par production d'enzymes**

Les antibiotiques sont susceptibles d'être dégradés par voie enzymatique. L'exemple le plus connu est l'hydrolyse du noyau bêta-lactame par des bêta-lactamases dont certaines de ces enzymes sont à spectre élargi (**Braford, 2001**).

D'autres enzymes hydrolysent de nombreux antibiotiques, tels céphotaximases (**Conton et Coque, 2006**). Les enzymes inactivant les aminosides sont divisées en trois classes : aminosides-phosphotransférases, aminosides-nucléotidyltransférases, aminoacétyltransférases (**Doi et Arakawa, 2007**).

Les streptogramines sont inhibés par streptogramine A (O-) acétyltransférase (**Suganito et Roderick, 2002**) et streptogramines B (CO-) lyase (**Mukhtar et al., 2001**) (**Figure N° 7**).



**Figure N° 7.** Mécanismes de résistance bactérienne aux antibiotiques. : ○ la substance antibiotique, : ☾ récepteur, : ▼ récepteur modifié, : 🗑 pompe d'efflux, : ✨ enzyme, : 💥 dégradation de l'antibiotique (**Hemaiswarya et al., 2008**).

# *Annexes*

**Annexe 01 :**

**Composition des milieux de culture utilisés pour la caractéristique préliminaire d'antibiotique produit par les actinomycètes**

**Milieu Muller –Hinton**

Agar ..... 10mg  
Extrait de viande .....2g  
Amidon .....1,5g  
Eau distillée .....1000ml  
Ph/7,0

**Milieu YMEA+CaCO<sub>3</sub>**

Agar .....20g  
Extrait de levure .....4g  
Extrait de malte .....10g  
Glucose .....4g  
CaCO<sub>3</sub> .....1g  
Eau distillée .....1000ml  
PH : 7,3

**Milieu PDA**

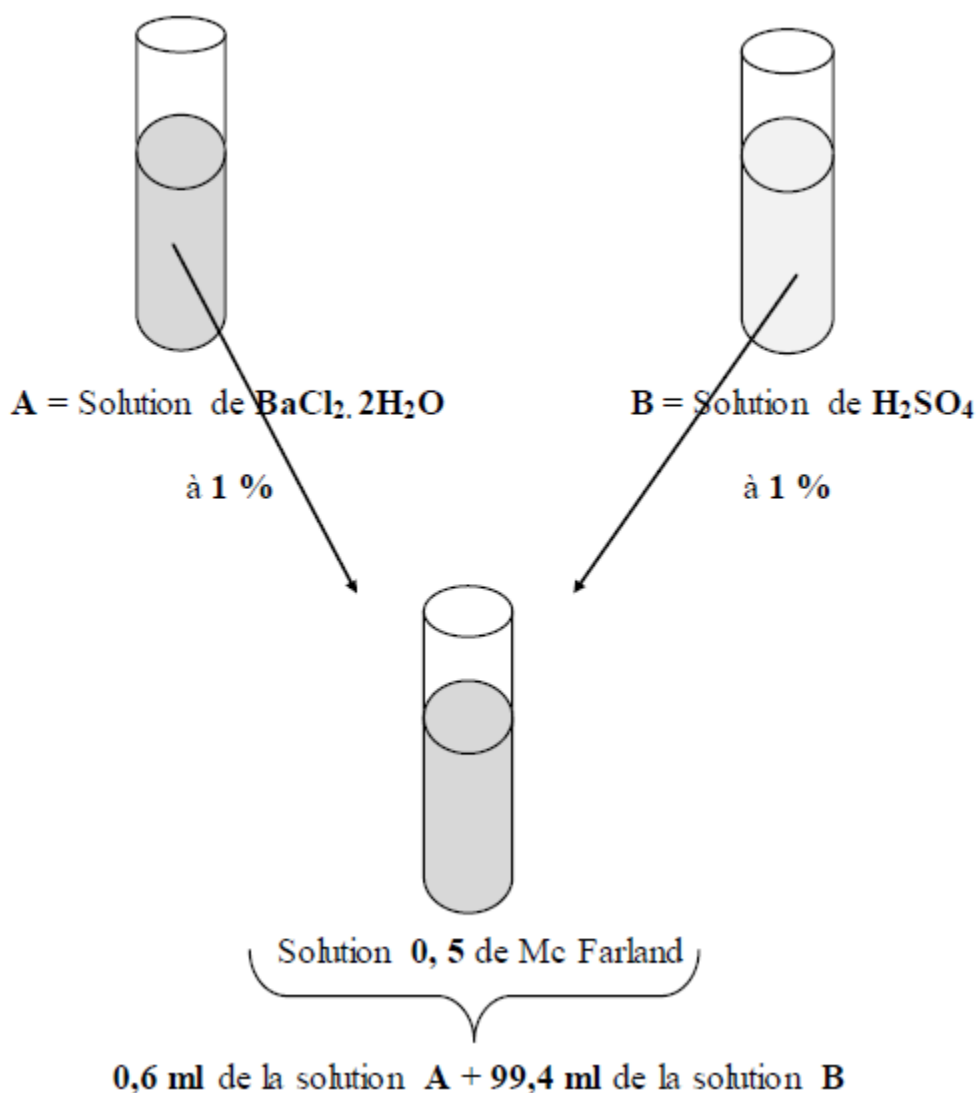
Agar .....20g  
Pomme de terre .....200g  
Glucose .....20g  
Eau distillée .....1000ml  
PH : 7,2

Annexe 02

Les compositions des solutions préparées

**A. Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland**

**A.1. Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland (Chessbrough, 2000)**



**A.2. Conditions de conservation de la solution 0, 5 de Mc Farland (Smibert et Kreig, 1994)**

**Conditions de conservation de la solution 0,5 de Mc Farland**

1/ à l'obscurité

2/ Température de conservation : 20-25 °C

**b. L'eau physiologie**

NaCl .....9g

Eau distillée .....1000ml

Stérilisation à l'autoclave

## Résumé

Les actinomycètes sont la principale source de la grande majorité des métabolites secondaires antimicrobiens. L'objectif de ce travail est donc rechercher le potentiel antimicrobien des actinomycètes étudiés en utilisant la souche elle-même et l'extrait d'antibiotique de cette dernière. C'est pour cela un total de 26 souches a été étudiées. L'activité antagoniste des isolats actinomycétales a été testée contre des bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que des champignons phytopathogènes par la technique des cylindres d'agar. L'extraction des molécules bioactives à partir de filtrat de culture des souches sélectionnées a été effectuée avec l'acétate d'éthyle et l'acétone (milieu liquide et solide). L'extrait brut a été testé par technique de diffusion par disque en papier. Une chromatographie sur couche mince a été effectuée sur les extraits bruts. Sur les 26 souches actinomycétales testées, en moins une souche a une activité en moins contre une bactéries testes. D'après nos résultats, on peut dire que la majorité des souches testées ont une activité importantes vis-à-vis les microorganismes testés. La souche lactuca LAC1 a démontrés une activité antagoniste importante. Les résultats obtenus par la méthode de cylindre d'agar sont meilleurs que ceux obtenus avec diffusion par disque. Les extraits bruts ont montrés une bonne activité contre les Gram positif. La technique de chromatographie sur couche mince de gel de silice pour l'extrait de la souche lactuca a révélé la présence d'au minimum deux molécules a activité antimicrobienne. Les résultats de la présente étude a démontré que les *Actinomycètes* présentent un potentiel important à produire des molécules à activités antimicrobiennes.

**Mots clés :** *Actinomycètes*, méthode de cylindre d'agar, méthode de diffusion par disque en papier, extrait, Antibiotique, activité antimicrobienne, lactuca.

## **Abstract**

Actinomycetes are the main source of secondary antimicrobial metabolites. So the purpose from this is to look for antimicrobial potential of actinomycetes that we are used, by using the strain itself and its extract, that's why we are used 26 lairs. The antagonist activity of the actinomycetes isolation have being tested against Gram negative and positif bacteria, and also phytopathogen fungi by using the technique of Agar's cylinder. The extraction of bioactives molecules by culture fultrat extract of the lairs that have being selected, was done by acetate ethyl and acetone (medium liquid and solid). The pure extract was tested by well disk diffusion. A chromatographie on thin lairs was used on pure extracts. From 26 actinomycetes tested strains at least one of this lairs has an activity at least against a bacteria test. From this study, we conclude (we can say) that the most of the tested lairs have an effective activity, the testes microorganisms. The strain Lac1 (lactuca) lair had demonstrated an effective antagonist activity. The obtained results by Agar's cylinder technique are much more butter than well diffusion disk. The pure extracts show a good activity against Gram positif bacteria. The chromatographie on thin lair of gel's silice technique for the Lactuca extract revealed at least two bioactives molecules with antimicrobial activity. So to conclude, the results of study demonstrate that *Actinomycetes* do have great potentials to product molecules with antimicrobial activity.

**Key words:** *Actinomycetes*, method Agar's cylinder, method well disk diffusion, extract, Antibiotique, antimicrobial activity, Lactuca.

**DEKHOUCHE SOUMIA**

**Date soutenance : 26/Juin/2014**

**Thème**

**EFFETS ANTAGONISTES ENTRE DES SOUCHES D'ACTINOMYCTES ET DES MICROORGANISMES PATHOGENES ET PHYTOPATHOGENES**

**Nature du diplôme: Master en microbiologie**

**Résumé**

Les actinomycètes sont la principale source de la grande majorité des métabolites secondaires antimicrobiens. L'objectif de ce travail est donc rechercher le potentiel antimicrobien des actinomycètes étudiés en utilisant la souche elle-même et l'extrait d'antibiotique de cette dernière. C'est pour cela un total de 26 souches a été étudiées. L'activité antagoniste des isolats actinomycétales a été testée contre des bactéries Gram positif et Gram négatif ainsi que des champignons phytopathogènes par la technique des cylindres d'agar. L'extraction des molécules bioactives à partir de filtrat de culture des souches sélectionnées a été effectuée avec l'acétate d'éthyle et l'acétone (milieu liquide et solide). L'extrait brut a été testé par technique de diffusion par disque en papier. Une chromatographie sur couche mince a été effectuée sur les extraits bruts. Sur les 26 souches actinomycétales testées, en moins une souche a une activité en moins contre une bactéries testes. D'après nos résultats, on peut dire que la majorité des souches testées ont une activité importantes vis-à-vis les microorganismes testés. La souche lactuca LAC1 a démontrés une activité antagoniste importante. Les résultats obtenus par la méthode de cylindre d'agar sont meilleurs que ceux obtenus avec diffusion par disque. Les extraits bruts ont montrés une bonne activité contre les Gram positif. La technique de chromatographie sur couche mince de gel de silice pour l'extrait de la souche lactuca a révélé la présence d'au minimum deux molécules a activité antimicrobienne. Les résultats de la présente étude a démontré que les *Actinomycètes* présentent un potentiel important à produire des molécules à activités antimicrobiennes.

**Mots clés :** *Actinomycètes*, méthode de cylindre d'agar, méthode de diffusion par disque en papier, extrait, Antibiotique, activité antimicrobienne, lactuca.

**Laboratoire de recherche : Institue de biologie**

**Rapporteur : LEULMI N.**

**Examineur : LABANI F/K.**

**Président : HIBA S.**

**Invité : DERBOUCHE A.**