

République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique

جامعة غرداية

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



كلية علوم الطبيعة والحياة
وعلوم الأرض

Département de Biologie

Université de Ghardaïa

قسم البيولوجيا

Mémoire en vue de l'obtention du diplôme de
Master académique en Sciences Biologiques
Spécialité : Biochimie appliquée

THEME

Activité antibactérienne de deux souches de *Streptomyces* sp. A12 et
G46 contre des souches bactériennes multi-résistantes

Présenté par :

Hadjadj Mebrouka

Membres du jury

Président	M.S. BELGHIT	MCB	Université de Ghardaïa
Examineur	M.G. DIF	MAA	Université de Ghardaïa
Examineur	M.A. BAKLI	MAA	Université de Ghardaïa
Encadreur	M.N. BOURAS	Prof.	Université de Ghardaïa

Mai 2017

REMERCIEMENTS

Remerciant tout d'abord ALLAH tout puissant de m'avoir donné le courage et la volonté de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier :

Profondément, mon encadreur Dr. Bouras Noureddine, Professeur à l'université de Ghardaïa pour le privilège et la confiance qu'il m'accordés durant l'étude pratique, et de m'avoir accepté de diriger ce travail avec compétence, pour sa disponibilité, son aide, sa patience, ainsi que pour ses précieux conseils ; je ne peux, monsieur, que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Egalement, le Dr Belghit Saïd Maître de conférences à l'université de Ghardaïa, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury auquel est soumise mon étude.

Monsieur G. DIF, Maître-assistant à l'université de Ghardaïa et Monsieur A. BAKLI Maître-assistant à la même université, de bien vouloir examiner et juger ce mémoire.

Infiniment et avec beaucoup de respect et gratitude Mr Benbrahim Fouzi qui nous a donné la chance d'arriver à ce jour.

Infiniment et avec beaucoup de reconnaissances, l'ensemble du personnel de laboratoire médicale d'établissement public du santé de proximité et l'établissement public hospitalier d' El Meniaa surtout Mr Hamel, aussi l'ensemble du personnel de laboratoire d'établissement public hospitalier Dr. Brahim Tirichine et les ingénieurs du laboratoire de microbiologie à l'université de Ghardaïa surtout Mr Fichem et Mr Moulay, pour leur aide et la mise à ma disposition du matériel de ses laboratoires et pour son aimable fourniture des souches.

Ainsi que toute personne ayant participé, de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Tous les enseignants de département des sciences de la nature et de la vie.

Dédicace

Je dédie ce travail à

Ma chère mère

Mon cher père

Ma chère grand-mère

Mes frères

Mes sœurs

Mes belles sœurs

Mes nièces et neveux

*Tous mes amis et surtout mes très chères sœurs Samira,
Hamida, Keltoum, Fatima, Khadidja, Rebha, Basma, Amel,
Mahdjouba.*

....À ma défunte amie Salima

Résumé

Ce travail a pour but la mise en évidence de l'activité antibactérienne et la production de molécules antibactériennes de deux nouvelles souches d'actinobactéries du genre *Streptomyces* nommé : A12 (isolée à partir du sol de la province de Masaka en Uganda) et G46 (isolée à partir d'un sol d'une palmeraie d'El Atteuf). La souche A12 est taxonomiquement rapprochée à l'espèce *S. samsunensis* M1463T avec un pourcentage de similarité de 99.50%. L'étude de l'activité antibactérienne testée contre 23 souches bactériennes cible sur milieu ISP2 solide révèle que la souche A12 possède une activité importante contre six bactéries à Gram positif : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Staphylococcus aureus* (43300), *Staphylococcus aureus* (25923), *Staphylococcus aureus* (639c) et *Staphylococcus aureus* (MRSA 2). La souche G46 possède une activité antibactérienne contre les mêmes bactéries test utilisé par la souche A12. Les cinétiques de production des antibiotiques ont été menées en milieux liquides ISP2 et Bennett pendant 10 jours et le jour optimal de production a ainsi été déterminé pour chaque souche par la méthode de diffusion en puits qui a montré que la meilleure activité antibactérienne est observée le cinquième jour pour la souche A12, et le troisième jour pour la souche G46. Les antibiotiques ont été extraits par quatre solvants organiques et les meilleurs solvants d'extraction ont été déterminés par antibiographie contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) dont le meilleur résultat est obtenu en utilisant l'acétate d'éthyle.

Mots clés : Actinobactérie, *Streptomyces*, Molécules Antibactériennes, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, acétate d'éthyle.

Abstract

The goal of this work is to study the antibacterial activity and the production of antibacterial molecules of two new strains of actinobacteria of the genus *Streptomyces* named respectively, A12 isolated from sandy soil from Masaka province in Uganda and G46 isolated from a soil of a palm grove of El Atteuf. The Strain A12 belonged to the genus *Streptomyces* and it's taxonomically closest to *S. samsunensis* M1463^T with a percentage of similarity of 99.50%. The study of the antibacterial activity tested against 23 target bacteria on solid ISP2 medium revealed that the strain A12 has an important activity against six Gram positive bacteria: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Staphylococcus aureus* (43300), *S. aureus* (25923), *S. aureus* (639c) and *S. aureus* (MRSA 2). The strain G46 has the same antibacterial activity against bacteria tested by strain A12. The production kinetics of antibiotics were carried out in liquid media ISP2 and Bennett for 10 days and the optimal day of production for each strain by the well diffusion method which showed that the better antibacterial activity for A12 was observed on the fifth day and the third day for strain G46. The antibiotics were extracted with four organic solvents and the best extraction solvent were determined by antibiography against *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932). The best result is obtained using ethyl acetate.

Key words: actinobacteria, *Streptomyces*, antibacterial molecules, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, ethyl acetate.

ملخص

الهدف من هذا العمل هو إظهار النشاط المضاد للبكتيريا، وإنتاج جزيئات مضادة للبكتيريا من طرف نوعين جديدين من سلالات الأكتينوبكتيريا من جنس *Streptomyces* الموسومة بـ A12 والمعزولة من تربة رملية من مقاطعة ماساكا في أوغندا و G46 والمعزولة من تربة من بستان نخيل من العطف. السلالة A12 تنتمي إلى جنس *Streptomyces* وتعتبر تصنيفيا تعتبر الأقرب إلى *S. samsunensis* M1463^T مع نسبة تشابه 99.50%. بعد اختبار نشاط هذه السلالات المضادة للبكتيريا في وسط صلب ISP2 ضد ثلاثة وعشرين سلالة مستهدفة ظهر أن السلالة A12 لها نشاط مهم ضد ست سلالات موجبة الغرام وهي *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)، *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932)، *Staphylococcus aureus* (43300)، *S. aureus* (25923)، *S. aureus* (639c) و *S. aureus* (MRSA 2). G46 لديها نشاط مضاد للجراثيم ضد نفس البكتيريا التي أثرت عليها A12. تم تنفيذ حركية الإنتاج للمضادات الحيوية في وسط مغذي سائل ISP2 خلال 10 أيام، وبالتالي تم تحديد اليوم الأمثل من الإنتاج لكل سلالة من خلال طريقة diffusion en puits التي أظهرت أن أفضل نشاط مضاد للبكتيريا لـ A12 لوحظ في اليوم الخامس واليوم الثالث لـ G46. تم استخلاص المضادات الحيوية بأربعة مذيبيات عضوية، وتم تحديد أفضل المذيبيات العضوية ضد *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932)، وتم الحصول على أفضل نتيجة باستخدام خلاص الإيثيل.

Table des matières

REMERCIEMENTS

Dédicace

Résumé

ملخص

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des tableaux

Introduction.....1

Partie I Revue Bibliographique

I. ACTINOBACTERIES	2
1. Détermination des actinobactéries.....	2
1.1. Définition de l'Ordre des Actinomycetales.....	2
1.2. Taxonomie des actinobactéries.....	2
1.2.1. Critères morphologiques.....	2
1.2.1.1. Caractères macromorphologiques (ou culturaux).....	3
1.2.1.2. Caractères micromorphologiques	3
1.2.2. Critères chimiques	4
1.2.2.1. Acides aminés.....	5
1.2.2.2. Glucides cellulaires	5
1.2.2.3. Phospholipides.....	5
1.2.3. Critères physiologiques	5
1.2.4. Critères moléculaires	5
2. Genre Streptomyces.....	6
2.1. cycle de vie des Streptomyces	6
2.2. Génétique.....	7
2.3. Ecologie.....	8
II. ANTIBIOTIQUES.....	9
1. Classification des antibiotiques	9
1.1. Classification selon leurs origines	9
1.2. Classification selon la structure	9
1.3. Classification selon l'activité antibactérienne	10
1.4. Classification selon le mode d'action.....	10
1.4.1. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi.....	10
1.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique	10
1.4.3. Antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines	11
1.4.4. Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques.....	11
1.4.5. Antibiotiques agissant par inhibition des voies métaboliques.....	11
2. Microorganismes producteurs d'antibiotiques	14

2.1. Actinobactéries	14
2.2. Bactéries non mycéliennes et champignons	14
3. Extraction de l'antibiotique	15
4. Résistance aux antibiotiques	15
4.1. Mécanismes enzymatiques	15
4.1.1. Les enzymes inactivant les β -lactamines	15
4.1.2. Les enzymes inactivant les aminosides	16
4.1.3. Les enzymes inactivant les phénicolés	16
4.2. Mécanismes non enzymatiques	17
4.2.1. Imperméabilité	17
4.2.2. Systèmes d'efflux	17
4.2.3. Altération des cibles d'antibiotiques	17
4.2.3.1. Modification de protéines liantes les pénicillines (PLP)	17
4.2.3.2. Modification de la cible ribosomique	17
4.2.4. Résistance par absence de site d'action	18
5. Recherche de nouveaux antibiotiques	18
5.1. Recherche de nouvelles molécules actives à partir du milieu naturel	18
5.2. Recherche de molécules actives sur des cibles spécifiques	18
5.3. Recherche de nouvelles molécules par hémisynthèse et par synthèse chimique totale	18
5.4. Recherche de nouvelles formulations d'antibiotiques	19

Partie II Matériel et méthodes

I. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE SUR MILIEUX

SOLIDES	21
1. Matériel biologique	21
1.1. Souches de Streptomyces	21
1.2. Les microorganismes-cibles	22
2. Milieux de culture	23
3. Antibiogramme des souches cible	24
4. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide	26

II. ETUDE DES ANTIBIOTIQUES

1. Production en milieu liquide et cinétique	28
1.1. Milieux de culture	28
1.2. Pré-cultures	28
1.3. Cinétique de production des antibiotiques	28
2. Test de l'activité de surnageant	29
3. Extraction des antibiotiques	29
4. Test d'antibiographie	31

Partie III Résultats et discussion

I. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE SUR MILIEUX

SOLIDES	32
1. Antibiogramme des souches cibles	32
1.1. Staphylococcus aureus	34
1.2. Antibiogramme des autres souches à Gram négatif et à Gram positif	35
2. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide	35
2.1. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide d'A12	36
2.2. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide de G46	40

II. ETUDE DES ANTIBIOTIQUES	43
1. cinétique de production en milieu liquide et test de l'activité de surnageant	43
2. Tests de l'activité antibactérienne à partir des extraits du filtrat de culture.....	50
Conclusion et perspectives	53
Références bibliographiques	55
Annexes	

Liste des abréviations

- **ADN**: Acide Désoxyribonucléique
- **ARN**: Acide Ribonucléique
- **AMC**: Amoxicilline + acide clavulanique
- **AMP**: Ampicilline
- **ATCC**: American Type Culture Collection
- **BLSE**: β -lactamases à spectre étendu
- **CACQE** : Centre Algérien de Contrôle de la Qualité et de l'Emballage
- **CMI** : Concentration minimale inhibitrice
- **CMB** : Concentration moyenne bactéricide
- **CIP**: Ciprofloxacine
- **CN** : Gentamycine
- **CTX**: Cefotaxime
- **c.sp** : chaînes de spores
- **DAP**: Acide diaminopimélique
- ***E. coli***: Escherichia coli
- **EUCAST**: The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing
- **EPH** : établissement publique hospitalier
- **EPSP** : établissement publique de santé de proximité
- **GN** : Gélose Nutritive
- **ISP2** : International *Streptomyces* Project
- **L** : *Listeria*
- **LBSM** : Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
- **LPS** : lipopolysaccharidique
- **MA**: Mycélium aérien
- **MH**: Mueller Hinton
- **μm** : micromètre
- **mL** : millilitre
- **MRSA**: *S. aureus* résistante à la méthicilline
- **MS**: Mycélium de substrat
- **pH**: potentiel d'hydrogène
- **PLP**: protéines liantes les pénicillines
- **P**: *Proteus*
- **P** : *Pseudomonas*
- **RF**: *Rectus flexibilis* (chaînes à spores droits à flexueuse).
- **RA**: *Retinaculum-Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles).
- **S**: *Spira* (chaînes spiralées).
- **S**: sporophore
- **S**: *Staphylococcus*
- **Sg**: sporanges
- **sp.**: espèce
- **ssp.**: sous espèce
- **sp.i**: spores mobiles

Liste des figures

- **Figure 01.** Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries.....4
- **Figure 02.** Cycle de vie de *Streptomyces* sp.....7
- **Figure 03.** Mécanismes d'action des antibiotiques.....12
- **Figure 04.** Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinobactéries, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses.....14
- **Figure 05.** Comportement d'une souche d'*Escherichia coli* BLSE, face à l'amoxicilline (AMX) et à l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC).....19
- **Figure 06.** Mécanismes biochimiques de résistance aux antibiotiques.....20
- **Figure 07.** Aspect macromorphologique de G46 sur milieu ISP2.....21
- **Figure 08.** Aspect macromorphologique d'A12 sur milieu ISP2.....21
- **Figure 09.** Micromorphologie de G46 sur milieu ISP2.....21
- **Figure 10.** Micromorphologie d'A12 sur milieu ISP2.....21
- **Figure 11.** Schéma résumant le test d'antibiogramme.....25
- **Figure 12.** Schéma résumant la méthode de stries croisées.....27
- **Figure 13.** Protocole d'extraction des antibiotiques à partir de mycélium et de filtrat de culture.....30
- **Figure 14.** Antibiogramme des souches de *Staphylococcus aureus*.....35
- **Figure 15.** Activité antibactérienne d'A12 contre *listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).....37
- **Figure 16.** Activité antibactérienne d'A12 contre *listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (culture d'A12 de 14 jours).....37
- **Figure 17.** Activité antibactérienne d'A12 contre les différentes souches de *Staphylococcus aureus*.....38
- **Figure 18.** Activité antibactérienne d'A12 contre les différentes souches de *Staphylococcus aureus* (culture d'A12 de 14 jours).....38
- **Figure 19.** Activité antibactérienne de G46 contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).....41
- **Figure 20.** Activité antibactérienne de G46 contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Staphylococcus aureus* (43300), *Staphylococcus aureus* (25923) et *Staphylococcus aureus* (MRSA 2).....41
- **Figure 21.** Activité antibactérienne de G46 contre *Staphylococcus aureus* 639c.....42
- **Figure 22.** Activité antibactérienne des deux *Streptomyces* contre les bactéries à Gram positif (culture de 10 jours).....43

- **Figure 23.** Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche A12 (Bennett) par la méthode des puits contre *L.monocytogenes* (ATCC 13932) du jour 1 au jour 10.....**45**
- **Figure 24.** Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche A12 (Bennett) par la méthode des puits contre *S.aureus* 639c du jour 1 au jour 10.....**46**
- **Figure 25.** Cinétiques de production des activités antimicrobiennes d'A12 en milieu liquide Bennett.....**46**
- **Figure 26.** Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche G46 (ISP2) par la méthode de diffusion sur puits contre *L.monocytogenes* (ATCC 13932) du jour 1 au jour 10.....**48**
- **Figure 27.** Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche G46 (Bennett) par la méthode de diffusion sur puits contre *L.monocytogenes* (ATCC 13932) du jour 1 au jour 10.....**48**
- **Figure 28.** Cinétiques de production des activités antimicrobiennes de G46 en milieu liquide ISP2.....**49**
- **Figure 29.** Zones d'inhibition des extraits du filtrat de culture de l'acétate d'éthyle à partir de G46 contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932).....**52**

Liste des tableaux

- **Tableau 01.**Classification des antibiotiques selon leur structure chimique.....13
- **Tableau 02.**Bacteries cibles utilisées.....22
- **Tableau 03.**Composition des différents milieux de culture utilisés.....23
- **Tableau 04.**Critères d'interprétation des disques d'antibiotiques.....26
- **Tableau 05.**Résultats de l'antibiogramme des souches cible.....33
- **Tableau 06.**Résultats du test de la production des métabolites antibactériens sur milieu solide de la souche A12.....36
- **Tableau 07.**Résultats du test de la production des métabolites antibactériens sur milieu solide de la souche G46.....40
- **Tableau 08.**Résultats de la cinétique de production de la souche A12 sur le milieu liquide ISP2.....44
- **Tableau 09.** Résultats de la cinétique de production de la souche A12 sur le milieu liquide Bennett.....45
- **Tableau 10.** Résultats de la cinétique de production de la souche G46 sur le milieu liquide Bennett.....47
- **Tableau 11.** Résultats de la cinétique de production de la souche G46 sur le milieu liquide ISP2.....47
- **Tableau 12.**Résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits du filtrat de culture.....51

Introduction

Les actinobactéries forment un grand nombre des microorganismes procaryotes appartenant à l'Ordre des *Actinomycetales*. Cet ordre regroupe des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage de guanine-cytosine élevé (supérieur à 55%) qui les différencie des autres bactéries (Goodfellow, 2012). Les actinobactéries renferment un groupe des bactéries filamenteuses (ramifiées en mycélium de structure analogue à celle des champignons). Mais malgré leur aspect morphologique, leur physiologie et leur organisation cellulaire sont de type procaryote et confirment leur classification parmi les bactéries (Bousseboua, 2002).

L'importance des actinobactéries a de tout temps été soulignée dans divers domaines : industriel, médical et vétérinaire, l'agriculture et l'agro-alimentaire (George *et al.*, 2012; Solecka *et al.*, 2012). Les actinobactéries sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne (Okami et Hotta, 1988). Les actinobactéries, surtout celles qui ont une structure mycélienne, en particuliers le genre *Streptomyces* sécrètent près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (Solecka *et al.*, 2012). D'autres molécules bioactives sont également sécrétées par ce groupe microbien, telles que les enzymes, les vitamines, les insecticides, les herbicides, etc. (Genilloud *et al.*, 2011).

Depuis que l'utilisation répandue de la chimiothérapie antimicrobienne a commencé dans les années 1950, il est apparu, grâce à la surveillance des résistances, que presque tous les microorganismes pathogènes avaient développé une résistance à des agents chimiothérapeutiques ceci en grande partie en raison de leur mauvaise utilisation. Quelques germes pathogènes ont développé une résistance à tous les agents antimicrobiens connus. Pour cela et en premier lieu, la biodiversité est exploitée. L'isolement de *Streptomyces* à partir d'écosystèmes permet éventuellement, la découverte de souches pouvant avoir un potentiel de production d'antibiotiques élevé ou inexploité (Groth *et al.*, 1999; Rajan et Kannabiran, 2010). En plus, l'utilisation de bactéries résistantes aux antibiotiques comme germes tests peut conduire à la découverte de molécules efficaces qui peuvent être nouvelles (Oiwa, 1992; Rajan et Kannabiran, 2010).

Dans cette même approche, l'objectif du présent travail est d'étudier l'activité antibactérienne de deux nouvelles souches d'actinobactéries du genre *Streptomyces* A12 isolés à partir du sol de la province de Masaka en Uganda et G46 à partir d'un sol d'une palmeraie d'El Atteuf contre 23 souches pathogènes collecté au niveau de L'établissement public hospitalier d'El Meniaa et le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

Partie I
Revue Bibliographique

I. ACTINOBACTERIES

1. Détermination des actinobactéries

1.1. Définition de l'Ordre des *Actinomycetales*

Dans les précédentes éditions du manuel de détermination bactériologique de Bergey (1989 et 1994), l'Ordre des *Actinomycetales* était défini comme regroupant des bactéries à Gram positif qui tendent à former un véritable mycélium ramifié. Dans l'édition (Bergey de 2004) et du fait de l'adoption des caractéristiques génétiques en taxonomie, plusieurs formes bactériennes non mycéliennes ont été rattachées à cet Ordre sur la base de leurs parentés phylogénétiques avec les autres membres de ce groupe. Ainsi, dans cette même édition, l'Ordre des *Actinomycetales* est défini comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un taux élevé en guanine + cytosine (G + C) dans leur patrimoine génétique (supérieur à 55 %) et qui forment un groupe homogène sur la base des données de la biologie moléculaire (séquençage de l'ADN ribosomique 16S, hybridation ADN-ADN).

La plupart des actinobactéries sont terrestres, certaines espèces sont marines (Mincer *et al.*, 2002). Les actinobactéries sont répandus dans l'environnement et la plupart des espèces sont chimioorganotrophes, aérobies, mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité optimale à la neutralité (Williams et Wellington, 1982; Goodfellow et Williams, 1983 *In* Kerbab, 2012). Les facteurs importants contrôlant l'abondance et l'activité des actinobactéries dans le sol sont : la disponibilité des nutriments, la nature et l'abondance de la matière organique, la salinité, la teneur en humidité relative, la température, le pH et la végétation du sol (Goodfellow et Williams, 1983 *In* Kerbab, 2012).

1.2. Taxonomie des actinobactéries

La taxonomie des actinobactéries est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimiotaxonomiques et génomiques. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le Manuel de Bergey, dont le plus récent comprend un volume en deux parties dédié aux *Actinobacteria* (Goodfellow *et al.*, 2012).

1.2.1. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques importants permettant de différencier les genres d'actinobactéries entre eux, sont les suivants:

1.2.1.1. Caractères macromorphologiques (ou cultureux)

Ces caractères reposent sur la production ou non d'un mycélium aérien (MA), la présence d'un mycélium du substrat (MS), la production ou non de pigments mélanoides, ainsi que la détermination de la couleur du MA, du MS et des pigments diffusibles. Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs (Tomatia, 2010).

1.2.1.2. Caractères micromorphologiques

Ils consistent à déterminer par observation directe au microscope optique (objectifs 10 et 40) des cultures poussant sur les milieux gélosés. Certains détails nécessitent l'observation entre lame et lamelle en utilisant l'objectif 100 du microscope optique ou parfois l'utilisation du microscope électronique à balayage ou à transmission (Tresner *et al.*, 1961; Holt *et al.*, 1994 *In* Tomatia, 2010). Les observations portent sur le MA et le MS (Tomatia, 2010)

- **Mycélium aérien (MA)**

Le mycélium aérien peut être stérile, fragmenté ou sporulant. Les spores sont généralement non mobiles, isolées ou regroupées par deux, par quatre ou en chaînes plus ou moins longues. Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores courts ou longs ou encore formées anarchiquement sur le MA. Chez le genre *Streptomyces*, les chaînes de spores peuvent être droites à flexueuses (type RF = *Rectus Flexibilis*), en crochets ou en boucles fermées (RA = *Retinaculum Apertum*) ou encore spiralées (type S = *Spira*). La surface des spores (observée au microscope électronique) peut être lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue. Quelques genres d'actinobactéries possèdent des structures particulières, comme les sporanges, les sclérotés ou les endospores (Tomatia, 2010)

- **Mycélium du substrat (MS)**

Le MS peut être stérile ou non, fragmenté ou persistant. Il peut produire ou non des spores (mobiles ou non) ou des sporanges. La Figure 01 montre la micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Tomatia, 2010).

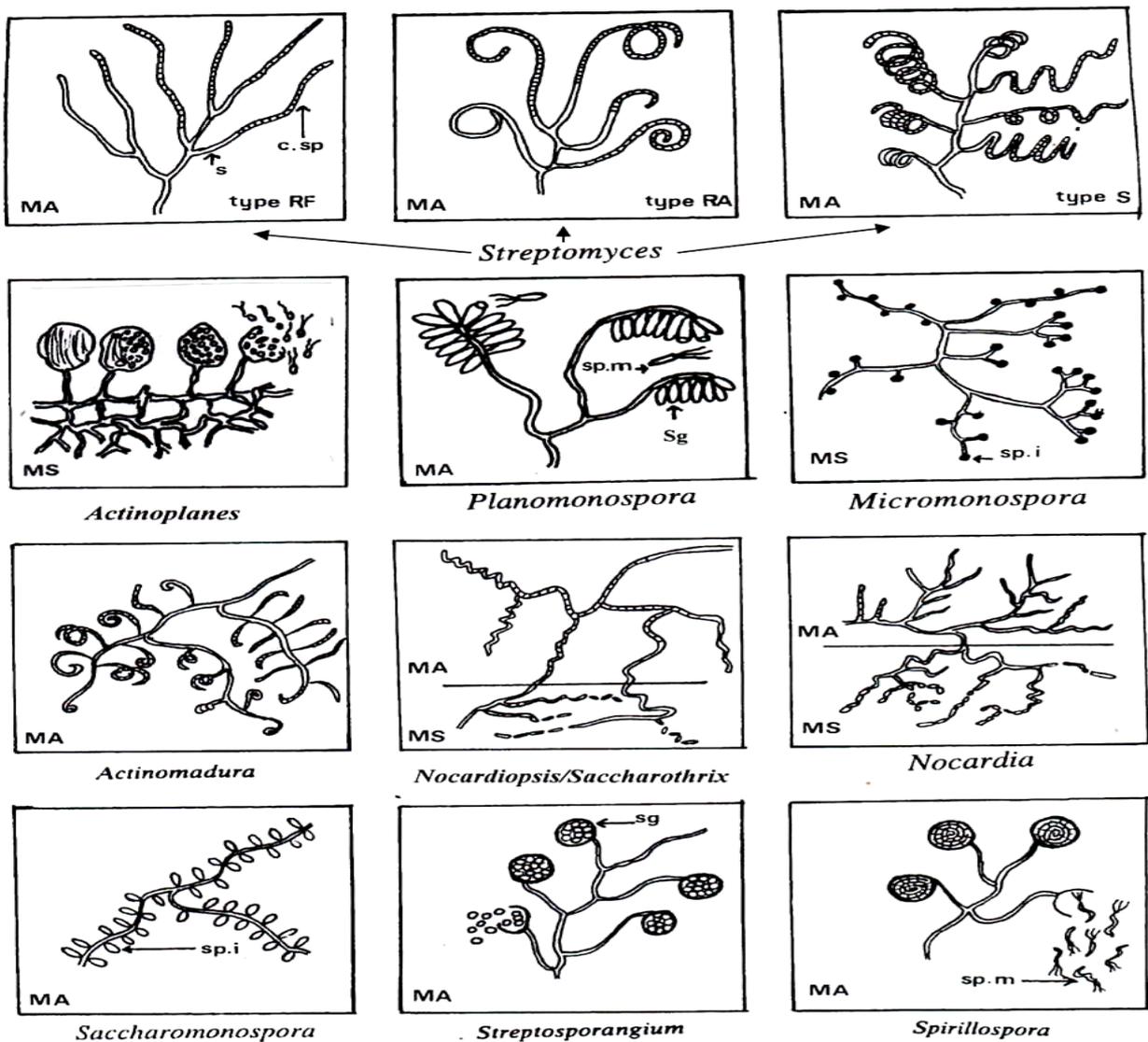


Figure 01. Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Sabaou, 1988)

MA = mycélium aérien; MS = mycélium de substrat; RF = *rectus flexibilis* (chaines a spores droits à flexueuse); RA = *retinaculum-Apertum* (chaines en crochets ou en boucles); S = *Spira* (chaines spiralées); S = sporophore; c.sp = chaines de spores; sp.i = spores mobiles; sg = sporanges.

1.2.2. Critères chimiques

Ils reposent sur l'analyse des constituants majeurs qui se trouvent au niveau de la paroi cellulaire, de la membrane plasmique ou des cellules entières et sont essentiels pour la détermination des genres.

1.2.2.1. Acides aminés

L'analyse des acides aminés est utilisée pour déterminer des chimiotypes. Deux acides aminés sont taxonomiquement très importants, l'acide diaminopimélique (DAP), qui peut être sous deux formes, LL ou DL (*méso*) selon les genres, et la glycine qui peut être présente ou absente.

1.2.2.2. Glucides cellulaires

Les sucres des cellules entières sont classés en «non caractéristiques», c'est-à-dire taxonomiquement non importants (ribose, glucose, galactose, mannose;) et en «caractéristiques» ou taxonomiquement importants (couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose » et « rhamnose-galactose » ou encore le madurose ou 3-*O*-méthylgalactose, lesquels caractérisent certains genres) (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

1.2.2.3. Phospholipides

La composition des actinobactéries en phospholipides est également un critère de détermination. La diversité des phospholipides a permis à Lechevalier et al. (1977) de distinguer cinq types notés de PI à PV et caractérisés par la présence généralement d'un ou de deux phospholipides caractéristiques.

1.2.3. Critères physiologiques

L'étude physiologique permet de distinguer les espèces d'actinobactéries appartenant à un même genre. Ces tests portent sur la dégradation ou non de plusieurs composés (glucidiques, lipidiques, protidiques ou autres) et la sensibilité ou la résistance à quelques agents physiques et chimiques (pH, température, concentration ionique, antibiotiques, etc.). Cette étude est confrontée à un certain problème, qui est celui de bien choisir les caractères discriminants pour mieux différencier les espèces entre elles (Goodfellow *et al.*, 1990).

1.2.4. Critères moléculaires

Actuellement, les caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimiques sont considérées comme insuffisantes pour l'identification précise des espèces. L'introduction d'outils moléculaires a manifestement amélioré les techniques d'identification. Fiables et rapides, ces

techniques sont applicables à tout organisme dont l'ADN, l'ARN ou leurs produits (les protéines) peuvent être isolés. Elles ont ainsi permis de tracer la phylogénie des actinobactéries (Stackebrandt et Woese, 1981; Stackebrandt *et al.*, 1997; Rheims *et al.*, 1999), de regrouper ou de séparer des espèces entre elles (Fisher *et al.*, 1983; Miyadoh *et al.*, 1990; Ochi *et al.*, 1993) ou de fusionner des genres entre eux (Stackebrandt et Kroppenstedt, 1987).

Les principales analyses moléculaires utilisées en taxonomie pour la détermination des espèces sont le séquençage de l'ADN ribosomique 16S (partie de l'ADN codant pour la synthèse de l'ARN ribosomique 16S) et l'hybridation ADN-ADN.

2. Genre *Streptomyces*

C'est le plus grand genre du monde bactérien, avec environ 802 espèces décrites (Euzéby, 2017). Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à coloration de Gram positive, chimioorganotrophes, catalase positive qui appartiennent à l'Ordre *Actinomycetales* de la Classe *Actinobacteria* (Stackebrandt *et al.*, 1997). Il appartient à la famille des *Streptomycetaceae* et au sous-ordre des *Streptomycineae*. Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux G+C% compris entre 69 et 78% (Korn-Wendisch et Kutzner, 1992; Hodgson, 2000; Stackebrandt et Schumann, 2006). La présence de l'acide LL diaminopimelique et de glycine et l'absence de sucres caractéristiques est typique pour ce type de paroi cellulaire (Uchida et Seino, 1997; Stackebrandt et Schumann, 2006).

Morphologiquement, il possède un mycélium du substrat abondamment ramifié, généralement non sporulé, surmonté par un mycélium aérien produisant des sporophores qui donnent naissance à des chaînes de spores de formes variées: droites (*Rectus Flexibilis*), incurvées ou en boucles (*Retinaculum Apertum*) ou spiralées (*Spira*). Les spores (ou conidies) ne sont pas mobiles et ont une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue. Les *Streptomyces* possède le chimiotype IC, des phospholipides de type PII et un taux de GC compris entre 68% et 78% (Bergey, 2004).

2.1. Cycle de vie des *Streptomyces*

La cellule bactérienne initiale, appelée erronément « spore libre » croît à la surface du milieu de support non seulement en s'allongeant (comme toute bactérie), mais aussi en se ramifiant et, même, en pénétrant en profondeur dans le milieu, sans qu'aucune septation n'apparaisse (=

mycélium). Après quelques jours, le mycélium produit des structures aériennes qui s'étendent en hauteur (= hyphes aériens). Ces structures vont développer des torsades, tel un tire-bouchon.

Leur partie terminale, après une série de réplifications montre l'apparition d'un nombre important d'événements de septation, qui sont à la base de la formation d'autant de jeunes cellules bactériennes qui vont, après maturation et libération, donner naissance à de nouvelles formes libres, pour que le cycle vital recommence (Zouaghi, 2007).

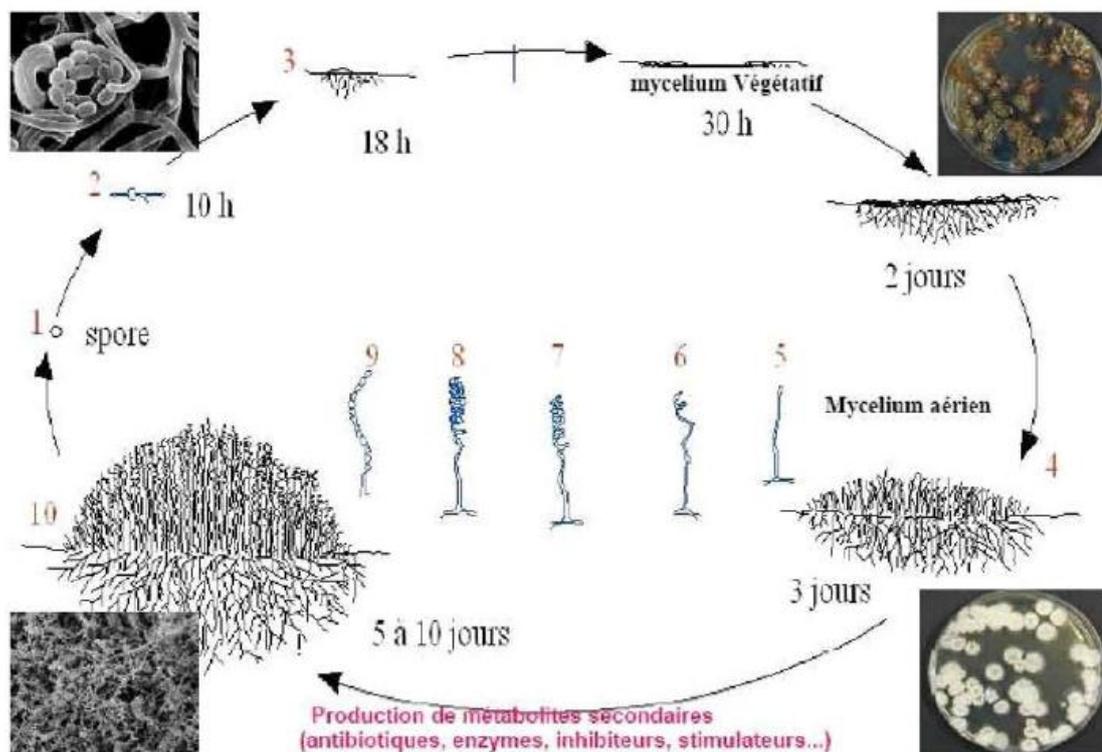


Figure 02. Cycle de vie de *Streptomyces* sp. (Zouaghi, 2007)

2.2. Génétique

Le génome des *Streptomyces* est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grandes tailles ainsi que des plasmides circulaires. Les membres de la famille des *Streptomycetaceae* doivent avoir comme caractéristiques les séquences de nucléotides « signatures » suivantes:

71 (G), 543 (A-U), 603-635 (C-G), 610 (A), 747 (A), 952-1229 (U-A), 80-89 (G-C), 81-88 (C-G), 82-87 (U-G), 127-234 (G-C), 209 (C), 210 (C), 211 (G), 610 (G), 671-735 (U-A), 819 (G), 837-849 (C-G), 950-1231 (U-G), 955-1225 (C-G), 965 (C), 1254-1283 (A-U) et 1409-1491 (C-G).

2.3. Ecologie

Les Streptomycètes sont très importants d'un point de vue écologique et médical. Le sol constitue le biotope naturel de la majorité de ces microorganismes, milieu dans lequel ils peuvent représenter 20 % de la microflore cultivable. En fait, l'odeur de terre humide est en grande partie due à la production de substances volatiles, telles que la géosmine, par les Streptomycètes (Alexander, 1977).

Comme beaucoup de microorganismes du sol, la plupart des *Streptomyces* se comportent en bactéries mésophiles (avec une croissance maximale à une température variant entre 25°C à 30°C) et neutrophiles (croissance entre pH 5 et 9 avec un maximum autour de la neutralité) (Madigan et Martinko, 2007). Cependant, quelques *Streptomyces* sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 colonisant ainsi les sols acides (Alexander, 1977).

Ces microorganismes jouent un rôle majeur dans la minéralisation. Ils peuvent dégrader, en aérobiose, des substances résistantes telles que la pectine, la lignine, la cellulose, la chitine, la kératine, le latex et les composés aromatiques (Zouaghi, 2007).

Les streptomycètes ont pour la plupart un comportement de saprophytes non pathogènes; mais quelques-uns sont pathogènes de plantes et des animaux, par exemple *S. somaliensis* est associé aux actinomycétomes: infection des tissus sous-cutanés engendrant des gonflements, des abcès et même d'une destruction osseuse en absence de tout traitement (Zouaghi, 2007).

II. ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques constituent la part la plus importante des applications industrielles des actinobactéries et principalement des *Streptomyces*.

Les antibiotiques sont définis comme toute substance antibactérienne d'origine biologique, synthétique ou semi synthétique, capable d'inhiber sélectivement certaines voies métaboliques des bactéries, sans exercer habituellement d'effets toxiques pour les organismes supérieurs (Perronne, 1999). Quelle que soit l'origine de l'antibiotique, il doit avoir les propriétés suivantes : une activité antibactérienne, une toxicité sélective, une possibilité d'absorption et de diffusion dans l'organisme.

1. Classification des antibiotiques

1.1. Classification selon leurs origines

Les antibiotiques sont classés en suivant leur origine en :

- **Antibiotiques naturels** : élaborés par des microorganismes telluriques procaryotes ou eucaryotes:
 - Bactéries du sol : *Streptomyces*, *Actinomyces*, *Bacillus*, *Pseudomonas*, etc.
 - Champignons : *Penicillium*, *Fusidium*, etc.

Ces dernières années, de nouveaux composés antibactériens ont été découverts, dont plusieurs sont secrétés par des souches de *Streptomyces*, tel que les lipopeptides cycliques (Balz *et al.*, 2005), les platensimycines (Metzger *et al.*, 2009), les streptogramines (Haste *et al.*, 2010). D'autres composés antibactériens ont également été isolés à partir d'actinobactéries appartenant à des genres rares, comme c'est le cas de thiazomycines (Junker *et al.*, 2009) et de la paragamycine A (Hashizume *et al.*, 2010), élaborées par des espèces d'*Amycolatopsis*, ainsi que les polyketides polycycliques secrétés par *Verrucosispora maris* (Roh *et al.*, 2011).

- **Antibiotiques de synthèse** : rarement issus de pure synthèse comme les quinolones. Actuellement, les antibiotiques sont très souvent obtenus par semi-synthèse.

1.2. Classification selon la structure

Les molécules qui présentent une structure chimique de base identique sont regroupées dans une même famille, bien que certaines ne comportent parfois qu'un ou deux représentants (Tableau 01).

1.3. Classification selon l'activité antibactérienne

En se basant sur les paramètres suivants: temps dépendance, concentration dépendance et l'effet post antibiotique, on distingue deux classes d'antibiotiques: Antibiotiques bactéricides et bactériostatiques :

- **Les bactéricides** : Entraînent une destruction bactérienne (CMB \approx CMI).

Exemple : les bêta-lactamines, les aminosides, les quinolones, etc.

- **Les bactériostatiques** : Arrêt de la multiplication bactérienne (CMB très élevée).

Exemples : le chloramphénicol, les lincosamines, les macrolides, les sulfamides, les tétracyclines, etc (Mahmoudi et Massen, 2013).

1.4. Classification selon le mode d'action

Le mécanisme d'action des antibiotiques est le support de leur toxicité sélective, c'est ce qui les différencie des antiseptiques. Ils interviennent généralement soit au niveau de la paroi bactérienne, de la membrane cytoplasmique, de la synthèse des protéines ou des acides nucléiques (Figure 03) (Mahmoudi et Massen, 2013).

1.4.1. Antibiotiques inhibiteurs de la synthèse de la paroi

La paroi bactérienne est une coque qui protège les bactéries de la pression osmotique de l'environnement. Le squelette de cette paroi est une macromolécule (le peptidoglycane). Les différences de structure de la paroi expliquent les différences de sensibilité des bactéries vis-à-vis des antibiotiques agissant à ce niveau. La destruction de la paroi entraîne la formation de sphéroplastes qui sont des bactéries dépourvues de paroi, incapables de se développer dans un milieu hypertonique; exemples : les β -lactamines et les glycopeptides (Mahmoudi et Massen, 2013).

1.4.2. Antibiotiques agissant sur la membrane cytoplasmique

Grâce à leur caractère amphipathique ces antibiotiques pénètrent dans la cellule bactérienne puis ils s'insèrent parmi les phospholipides de la paroi perturbant par la suite la perméabilité membranaire ; exemple : les polymyxines (Mahmoudi et Massen, 2013).

1.4.3. Antibiotiques actifs sur la synthèse des protéines

Les ribosomes des cellules procaryotes sont constitués de protéines différentes des cellules eucaryotes (sous unités lourdes et légères). Ces antibiotiques:

- Empêchent la fixation d'un nouvel acide aminé sur la chaîne (ex: macrolides).
- Empêchent ou perturbent la liaison de certains acides aminés entraînant une erreur de lecture.

Altèrent l'ADN nucléaire ou gênent sa répllication (ex: quinolones) (Mahmoudi et Massen, 2013).

1.4.4. Antibiotiques inhibiteurs des acides nucléiques

Ils perturbent la synthèse des acides nucléiques entraînant ainsi une modification du message génétique. L'ADN et l'ARN ne sont pas propres au monde bactérien. Ces antibiotiques qui agissent sur eux sont toxiques pour toutes les cellules (bactérienne ou non). Exemples : ansamycines, quinolones et fluoroquinolones (Mahmoudi et Massen, 2013).

1.4.5. Antibiotiques agissant par inhibition des voies métaboliques

Les cellules procaryotes doivent synthétiser l'acide folique (les cellules eucaryotes assimilent directement cet acide apporté par l'alimentation). Il existe des antibiotiques qui perturbent le métabolisme de l'acide folique (Mahmoudi et Massen, 2013).

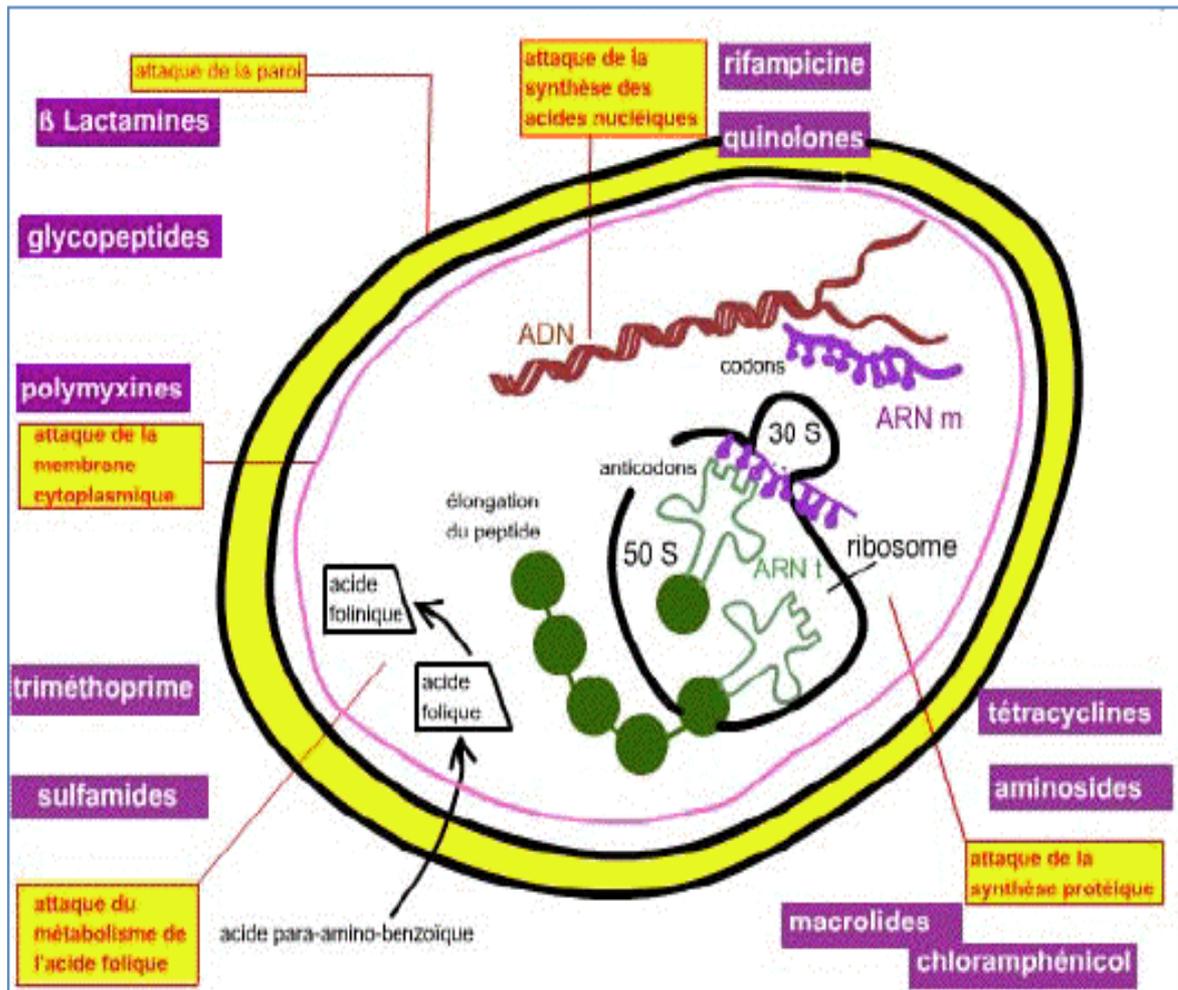


Figure 03. Mécanismes d'action des antibiotiques. (Lavigne, 2007).

Tableau 01. Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy *et al.*, 1987; Berdy, 2005).

Familles d'antibiotiques		Sous-familles	Exemples
1	Glucides et apparentés	Glucides purs	Nojirimycine.
		Aminoglycosides	Streptomycine, gentamicine, kanamycine.
		Glycosides	C-glycosides: vancomycine. N-glycosides: streptothricine.
		Glycolipides	Moenomycine
2	Lactones macrocycliques	Macrolides	Spiramycine, érythromycine.
		Polyènes	Amphotéricine, nystatine, candidine.
		Macrotétrolidés	Tetranactine, nonactine.
		Macrolactames	Rifamycine.
3	Quinones et Apparentés	Polycycliques accolés linéairement	Tétracyclines.
		Dérivés naphtoquinoniques	Anthracyclines.
		Dérivés benzoquinoniques	Mitomycine.
4	Acides aminés et peptides	Dérivés d'acides aminés.	Cyclosérine, pénicilline, nocardine.
		Homopeptides	Bacitracine, cyclosporine
		Hétéropeptides	Aculéacine
		Peptolides	Valinomycine.
5	Hétérocycles à azote	Hétérocycles non accolés	Caerulomycine, mildiomyce.
		Hétérocycles accolés	Phénazines, herbicidine.
6	Hétérocycles à oxygène	Polyéthers	Monensine, nigéricine.
7	Composés alicycliques	Dérivés du cycloalcane	Cycloheximide.
		Terpènes.	Acide marasmique
		Oligoterpènes	Acide fusidique.
8	Aromatiques	Dérivés benzéniques	Chloramphénicol.
		Aromatiques à cycles accolés	Griséofulvine.
		Composés non benzéniques	Fusariocine.
		Autres dérivés aromatiques	Novobiocine.
9	Aliphatiques	Dérivés des alcanes	Élaiomycine.
		Dérivés d'acides carboxyliques	Cérulénine.
		Composés contenant du phosphore ou du soufre	Fosfomycine

2. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

2.1. Actinobactéries

Le genre *Streptomyces* est le producteur du plus grand nombre de molécules actives, soit 80% des antibiotiques produits par les actinobactéries (Berdy, 2005). Il est à noter qu'environ 10% des antibiotiques sont sécrétés par les souches de *Micromonospora* et de *Nocardia*, tandis que les 10% restants le sont par les autres genres, peu répandus ou parfois même rares tels que *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc. (Lazzarini *et al.*, 2000). Plusieurs molécules bioactives sont commercialisées, comme la streptomycine, la kanamycine, le chloramphénicol, la néomycine, la novobiocine, etc. (Berdy, 2005).

2.2. Bactéries non mycéliennes et champignons

Les bactéries non mycéliennes produisent environ 10% des antibiotiques d'origine microbienne, dont 7% sont élaborés par les *Bacillaceae* (ex.: *Bacillus subtilis*) et 1,3% par les *Pseudomonadaceae* (ex.: *Pseudomonas*). D'autres bactéries de genres très divers en produisent également (1,7%), tels que *Micrococcus*, *Proteus*, *Chromobacterium* (Breton *et al.*, 1989).

Parmi les 125000 espèces de champignons décrites, environ 2000 sont productrices d'antibiotiques. Le nombre d'antibiotiques d'origine fongique est supérieur à 1200. Les plus importants antibiotiques d'origine fongique sont les pénicillines et les céphalosporines (Barrett, 2002).

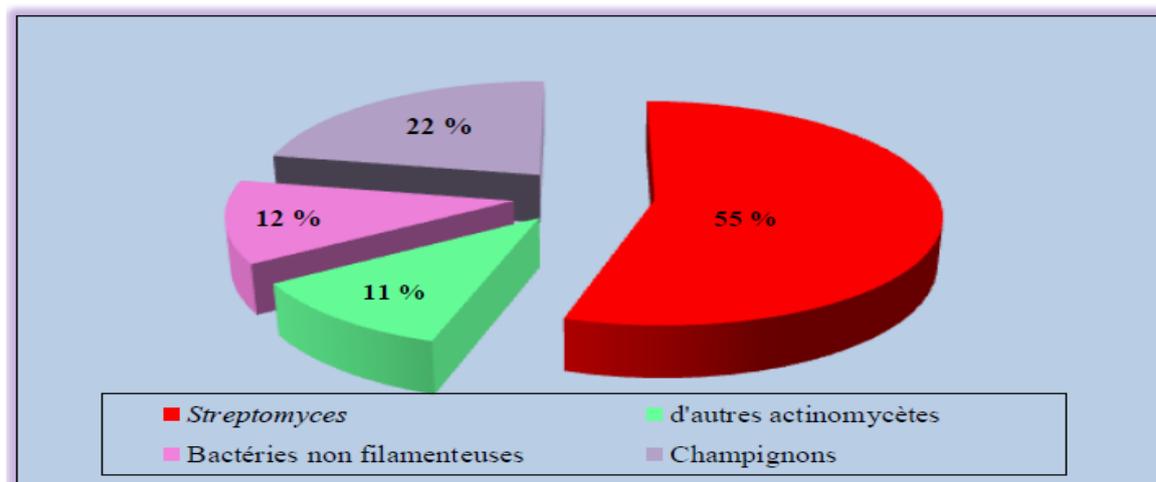


Figure 04. Secteur angulaire montrant la répartition de production des antibiotiques entre les actinobactéries, les champignons, et d'autres bactéries non filamenteuses (Berdy, 2005)

3. Extraction de l'antibiotique

L'extraction et la purification des antibiotiques comme toutes molécules antimicrobiennes à partir de bouillon de fermentation ont nécessité la mise au point d'un protocole d'extraction et de purification qui exploite au mieux les propriétés des molécules bioactives (Theilleux, 1993).

Un schéma général d'extraction des antibiotiques n'est pas applicable car au sein de la même famille, chaque antibiotique représente un cas lié à ses caractéristiques physico-chimiques propres à la composition du milieu de culture en fin de fermentation. Néanmoins, une démarche contenant des opérations de base doit être appliquée au début du protocole (Theilleux, 1993).

➤ Extraction aux solvants organiques

Le but de l'extraction à l'aide des solvants organiques est de faire passer l'antibiotique de la phase aqueuse à la phase organique. Cette opération permet déjà de purifier partiellement les molécules présentes dans le surnageant. Le choix du solvant dépend de la stabilité des substances antimicrobiennes dans le solvant lors de l'extraction (Zouaghi, 2007).

4. Résistance aux antibiotiques

Pour survivre, la bactérie échappe à l'action des antibiotiques par plusieurs mécanismes qui sont classés en deux principaux types: les mécanismes non enzymatiques (intrinsèques) et les mécanismes enzymatiques.

4.1. Mécanismes enzymatiques

Des exemples de mécanismes de résistance enzymatiques aux β -lactamines, aux aminosides et aux phénicolés sont donnés ci-dessous.

4.1.1. Les enzymes inactivant les β -lactamines

Plusieurs bactéries appartenant produisent des enzymes inactivant les antibiotiques, telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* et *Salmonella enterica* qui présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines (ampicilline-amoxicilline) et aux carboxypénicillines.

Cette résistance est due à une pénicillinase constitutive (Cattoir, 2004). D'autres bactéries à Gram négatif telles *Enterobacter*, *Proteus* et *Serratia* présentent une résistance aux aminopénicillines et aux céphalosporines de 1^{ère} génération, mais sont sensibles aux carboxypénicillines. Cette résistance est due à une céphalosporinase chromosomique (Yala *et al.*, 2001).

Les bêta-lactamases représentent le mécanisme essentiel de la résistance acquise aux β -lactamines, par un clivage dans le cycle β -lactame. La synthèse d'une ou de plusieurs β -lactamases représente le mécanisme le plus efficace utilisé par les bactéries pour échapper à l'action létale des β -lactamines; elles sont produites par quelques bactéries à Gram positif et à Gram négatif (Aleksun, 2007).

Selon Villalobos et struelens (2006), les β -lactamases peuvent être regroupées en 3 catégories:

- Les pénicillinases actives sur la pénicilline G, l'ampicilline et la carbénicilline.
- Les β -lactamases à spectre étendu (BLSE) actives sur les pénicillines et les céphalosporines, y compris celles de troisième génération.
- Les bêta-lactamases résistantes aux inhibiteurs de β -lactamases.

4.1.2. Les enzymes inactivant les aminosides

Les enzymes inactivant les aminosides sont constitutives et intracellulaires: elles sont classées en trois catégories d'après la réaction assurée: aminoside adényltransférases et aminoside phosphotransférases; seules ces dernières confèrent un haut niveau de résistance (Cavallo *et al.*, 2004).

4.1.3. Les enzymes inactivant les phénicolés

Une résistance au chloramphénicol est due à la production d'une chloramphénicol acétyltransférase plasmidique détectée chez certaines espèces d'entérobactéries telles que *Salmonella typhi*, *Pseudomonas* et *Yersinia* (Cavallo *et al.*, 2004). Cependant, il existe également une résistance au chloramphénicol par le biais d'une nitroréductase (Smith et Erwin, 2007).

4.2. Mécanismes non enzymatiques

4.2.1. Imperméabilité

Les bactéries résistent naturellement à plusieurs antibiotiques hydrophiles par l'existence de l'enveloppe externe qui est hydrophobe grâce à son composant lipopolysaccharidique (LPS) présent chez les bactéries à Gram négatif (Cavallo *et al.*, 2004).

Des protéines appelées « porines », possédant des canaux centraux, permettent le passage de molécules hydrophiles de petite taille comme les β -lactamines, les aminosides et les phénicolés. Des mutations entraînent des modifications quantitatives ou qualitatives de l'expression des porines, responsables de la résistance acquise à plusieurs familles d'antibiotiques (Cavallo *et al.*, 2004).

4.2.2. Systèmes d'efflux

Ce mécanisme repose sur l'expulsion des antibiotiques hors de la cellule bactérienne. Il est actif chez certaines bactéries qui ne possèdent pas un système de dégradation intracellulaire. L'efflux actif est souvent responsable d'une résistance de bas niveau (Cavallo *et al.*, 2004).

4.2.3. Altération des cibles d'antibiotiques

4.2.3.1. Modification de protéines liantes les pénicillines (PLP)

Les PLP sont des enzymes qui interviennent dans l'assemblage du peptidoglycane de la paroi. La fixation des β -lactamines sur ces PLP les inactive, ce qui mène au blocage de la formation de la paroi. La résistance acquise est due à une modification des PLP les rendant moins affines par rapport à l'antibiotique (Cavallo *et al.*, 2004).

4.2.3.2. Modification de la cible ribosomique

Le ribosome est le siège de la synthèse protéique et en même temps le site de fixation de quelques antibiotiques provoquant l'arrêt de la synthèse protéique. La modification de la cible ribosomale acquise par mutation diminue l'affinité du site de fixation de l'antibiotique et rend la bactérie résistante (Fauchère et Avril, 2002).

4.2.4. Résistance par absence de site d'action

Il existe également la résistance naturelle par absence de site d'action. Les bactéries résistent naturellement aux polyènes par absence de stérols. Les mycoplasmes et les champignons résistent aux pénicillines par absence de muréine (Aouiche, 2010).

5. Recherche de nouveaux antibiotiques

Avec l'apparition des multi résistances, l'industrie pharmaceutique et les chercheurs se sont tournés à nouveau vers la recherche d'antibiotiques dont l'activité serait plus performante tout en étant moins agressive pour l'organisme. Quatre grandes voies sont actuellement en exploitation:

5.1. Recherche de nouvelles molécules actives à partir du milieu naturel

La sélection de microorganismes a été remplacée par un criblage orienté faisant appel à des techniques génétiques précises de choix du microorganisme producteur, à l'isolement sélectif et au choix des microorganismes-cibles résistants (Larpen et Sanglier, 1989; Demain, 2006).

5.2. Recherche de molécules actives sur des cibles spécifiques

La paroi fongique est constituée de macromolécules (glucanes, mannanes et chitine, absents chez les cellules de mammifères ou de végétaux) pouvant être des cibles sélectives spécifiques des champignons (Kurtz, 1998). Ainsi, de nombreuses molécules agissant sur la biosynthèse de la paroi ont été découvertes, tels que les inhibiteurs des mannoprotéines (Takeuchi *et al.*, 1988), les polyoxines, inhibiteurs de la chitine synthétase (Mallié et Bastide, 2001) et les échinocandines, inhibiteurs de la glucane synthétase (Mora-Duarte *et al.*, 2002).

5.3. Recherche de nouvelles molécules par hémisynthèse et par synthèse chimique totale

L'hémisynthèse consiste à développer des dérivés d'antibiotiques, de façon à avoir des molécules plus actives, soit en modifiant la molécule d'origine de manière à la faire agir sur une cible légèrement différente, soit en lui adjoignant un inhibiteur du mécanisme de résistance lorsque celui-ci est connu (cas de « l'amoxicilline + acide clavulanique »; l'acide clavulanique étant un inhibiteur de β -lactamases). La Figure 05 montre la résistance d'une souche d'*Escherichia coli* produisant une β -lactamase à spectre élargi (BLSE), à l'amoxicilline et sa sensibilité à « l'amoxicilline + acide clavulanique » (Aouiche, 2010).

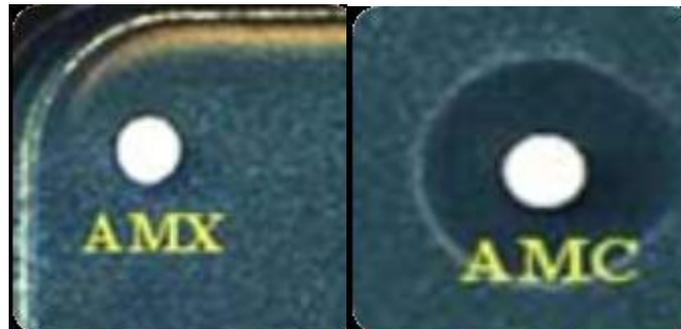


Figure 05. Comportement d'une souche d'*Escherichia coli* BLSE, face à l'amoxicilline (AMX) et à l'amoxicilline + acide clavulanique (AMC). (URL 01)

5.4. Recherche de nouvelles formulations d'antibiotiques

L'un des facteurs limitant l'utilisation thérapeutique des antibiotiques est leur faible solubilité. La recherche de nouvelles formulations afin de permettre une meilleure diffusion *in vivo* est une piste importante en antibiothérapie. L'exemple le plus édifiant dans ce domaine est le cas de l'amphotéricine B qui peut être sous trois formes: liposomale (Walsh *et al.*, 2000), complexe lipidique ou dispersion colloïdale (Graybill *et al.*, 2000).

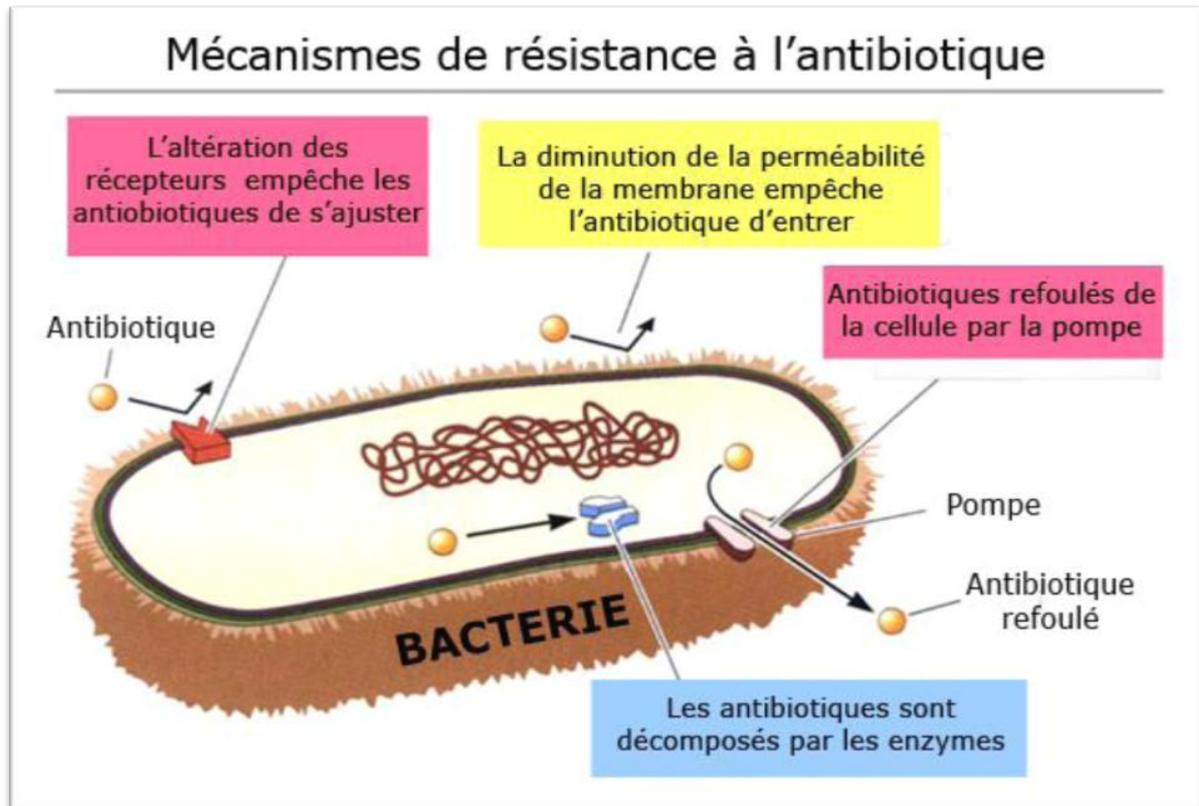


Figure 06. Mécanismes biochimiques de résistance (Lechat *et al.*, 1990)

Partie II
Matériel et méthodes

I. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE SUR MILIEUX SOLIDES

1. Matériel biologique

1.1. Souches de *Streptomyces*

La souche A12 est une nouvelle souche du genre *Streptomyces* isolée à partir d'un échantillon de sol de la province Masaka en Uganda. Cette souche est productrice d'antibiotiques non caractérisés à ce jour. L'analyse de sa séquence d'ADNr 16S a montré un taux de similarité de 99,50% avec la souche type *Streptomyces samsunensis* M1463^T.

La deuxième souche utilisée est une souche du genre *Streptomyces*, nommée G46, isolée à partir d'un sol saharien d'une palmeraie d'EL Atteuf. Les d'antibiotiques secrétés par cette souches non pas encore caractérisés.



Figure 07. Aspect macromorphologique des colonies de la souche G46 cultivée sur ISP2.



Figure 08. Aspect macromorphologique des colonies de la souche A12 cultivée sur ISP2.

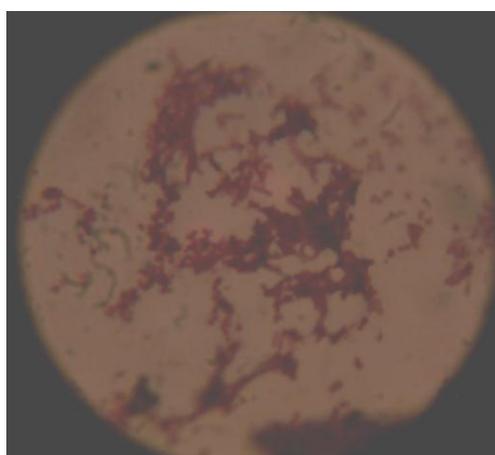


Figure 09. Aspect micromorphologique après la coloration de Gram des colonies de la souche G46.



Figure 10. Aspect micromorphologique après la coloration de Gram des colonies de la souche A12.

1.2. Les microorganismes-cibles

Les 23 bactéries-cibles utilisées sont représenté dans tableau 02.

Tableau 02.Les bacteries cibles utilisées.

microorganisme	nombre	origine
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	03	EPH
<i>Escherichia coli</i>	02	EPH
<i>Escherichia coli</i> BLSE	03	EPH
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	02	EPH
<i>Staphylococcus aureus</i> (H)	01	EPH
<i>Proteus mirabilis</i>	01	EPH
<i>Salmonella</i> sp.	01	EPH
Coliforme non déterminé	01	CACQE
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	01	ATCC
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	01	ATCC
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	01	ATCC
<i>Escherichia coli</i> (E52)	01	LBSM
<i>Staphylococcus aureus</i> (43300)	01	LBSM
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	01	LBSM
<i>Staphylococcus aureus</i> (639c)	01	LBSM
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA 2)	01	LBSM
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA 3)	01	LBSM

Ces souches bactériennes proviennent du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, d'EPSP, d'EPH d'El Meniaa, et du CACQE (centre algérien de contrôle de qualité et emballage) Ghardaïa.

Les bactéries multi-résistantes et sensibilisés appartiennent à des espèces les plus fréquemment isolées au niveau des hôpitaux sus-indiqués et sont responsables d'infections nosocomiales assez sévères.

2. Milieux de culture

Le milieu de culture, souvent utilisé pour la production d'antibiotiques, a été choisi pour la mise en évidence de l'antagonisme des deux souches d'actinobactéries est l'ISP2 (International *Streptomyces* Project).

Le milieu Mueller Hinton (MH) a été utilisé pour réaliser l'antibiogramme.

La Gélose nutritive (GN) a été utilisée pour le repiquage des microorganismes cibles.

La composition de chaque milieu est donnée ci-dessous :

Tableau 03. Composition des différents milieux de culture utilisés.

Composant	Concentration (g/L d'eau distillée)
Gélose nutritive	
extrait de viande	01
extrait de levure	2,5
peptone	05
chlorure de sodium (Na Cl)	05
Agar agar	15
pH : 7,0±0,2	
Mueller Hinton	
Peptone	17,5
Extrait de viande	02
Amidon	1,5
Agar agar	17
pH : 7,4±0,2	
ISP2	
Extrait de levure	04
Extrait de Malt	10
Glucose	04
Agar agar	15
pH 7.2±0,2	

3. Antibiogramme des souches cible

La sensibilité de toutes les souches cibles a été testée vis-à-vis de différents antibiotiques par la méthode de l'antibiogramme standard par diffusion sur gélose Muller Hinton (MH) selon les recommandations du comité Européen des antibiogrammes EUCAST (URL 02).

- **Inoculum :**

Généralement, 1 à 2 colonies ont été prélevées et dissociées dans 10 mL d'eau distillée stérile.

- **Ensemencement :**

- Les boîtes de gélose MH sont ensemencées par écouvillonnage à partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu de repiquage.

- On dépose les disques d'antibiotiques à tester (AMP, AMC, CL, CTX, CN, CIP).

- On incube les boîtes 24h à 37°C.

- **Lecture :**

Les différents diamètres des zones d'inhibition obtenus autour des disques d'antibiotiques sont mesurés à l'aide d'une règle. L'interprétation en sensible (S) ou résistante (R) est effectuée selon les critères définis par EUCAST (2013). Il y a actuellement une graduation à 3 niveaux de sensibilité :

S = bactérie sensible : la concentration minimale inhibitrice mesurée pour cette bactérie est inférieure à la concentration critique humorale de l'antibiotique administré par voie habituelle aux doses habituelles.

R = bactérie résistante : la concentration d'antibiotique qu'elle est capable de supporter est supérieure à la concentration critique chez le malade.

I = niveau intermédiaire : la concentration minimale inhibitrice est à la limite de ces concentrations critiques.



Figure 11. Schéma résumant le test d'antibiogramme.

Le Tableau 04 représente les critères d'interprétations des antibiotiques vis-à-vis les microorganismes cibles.

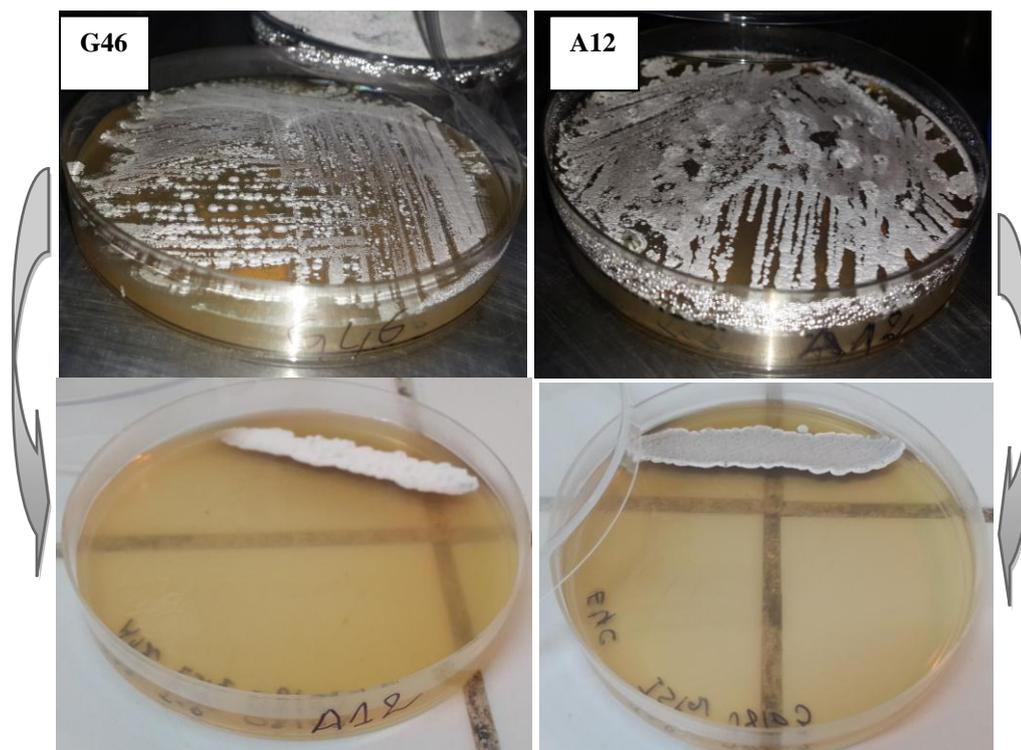
Tableau 04. Critères d'interprétation des disques d'antibiotiques.

antibiotique	CODE	Charge des Disques (µg)	Diamètres critiques en (mm)									
			<i>Enterobacteriaceae</i>			<i>Staphylococcus spp.</i>			<i>P. aeruginosa</i>			
			S ≥	I	R ≤	S ≥	I	R ≤	S ≥	I	R ≤	
Amoxicilline +acide clavulanique	AMC	30	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ampicilline	AMP	10	17	14-16	13	29	-	28	-	-	-	-
Gentamicine	CN	10	15	13-14	12	15	13-14	12	15	13-14	12	12
Ciprofloxacine	CIP	5	21	16-20	15	21	16-20	15	21	16-22	12	12
Cephalexine	CL	30	22	-	17	37	-	29	-	-	-	-
Cefotaxime	CTX	30	26	23-25	22	23	15-22	14	-	-	-	-

4 .Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne des actinobactéries est effectuée par la méthode des stries croisées (Figure 12). L'actinobactérie estensemencée sur le milieu solide en un seul trait en bordure de la boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à une température de 30°C pendant 10 jours pour permettre aux souches d'actinobactéries de croître et de sécréter leurs antibiotiques. Par la suite, les bactéries-cibles sontensemencées en traits perpendiculaires à celui de l'actinomycète.

La lecture des résultats se fait après 24-48 h en mesurant les distances d'inhibition en millimètre entre la bordure de l'actinomycète et celle de la bactérie-cible.



Stries ensemencés d'une manière horizontales



Ensemencement des bactéries cible perpendiculairement

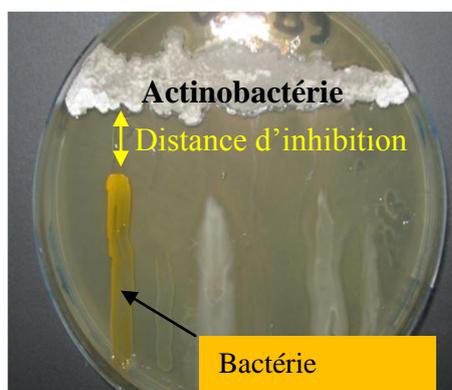


Figure 12. Schéma résumant la méthode des stries croisées.

II. ETUDE DES ANTIBIOTIQUES

1. Production en milieu liquide et cinétique

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne des deux souches d'actinobactéries sur milieux solides (ISP2), deux milieux de culture ont été choisis pour chaque souche en vue d'étudier leur cinétique de croissance et d'activité antimicrobienne en milieu liquide.

1.1. Milieux de culture

Deux milieux de culture liquides complexes sont utilisés: l'ISP2 et le milieu Bennett.

La composition du milieu Bennett est donnée ci-dessous: Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g; eau distillée: 1000 mL. pH 7,2.

1.2. Pré-cultures

Pour obtenir les pré-cultures, les spores sont raclées à partir d'une culture en boîte de Pétri de la souche d'actinobactérie âgée de 10 jours, et inoculées dans des tubes à vis contenant 3 mL de chaque milieu désiré à inoculer par la suite. Après 24 heures d'incubation dans un shaker (150 rpm; 30°C), les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production.

1.3. Cinétique de production des antibiotiques

La cinétique de production des antibiotiques a été réalisée en vue de déterminer le temps de production optimale dans des conditions déterminées et de comparer cette production entre les milieux de culture sélectionnés.

Notre objectif pour la cinétique n'est pas de déterminer le pH ni la biomasse mais pour déterminer le jour de production optimale en antibiotique, pour cela une cinétique classique n'est pas réalisée (en Erlenmeyer). En revanche, 20 tubes de chaque milieu de culture (à raison de 10 tubes pour chacune des souches de *Streptomyces*) sontensemencés avec deux carottes prélevées par l'emporte-pièce (07 mm de diamètre) pour chaque souche de *Streptomyces* étudiées.

Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 150 rpm dans un Shaker pendant une durée d'incubation de 10 jours. L'évolution de l'activité antibiotique est suivie quotidiennement.

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) pour la souche G46. En revanche, les deux bactéries : *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Staphylococcus aureus* 639c ont été utilisées pour la souche A12.

2. Test de l'activité de surnageant

Le test de diffusion en puits a été utilisé pour la recherche d'antibiotiques par les deux souches de *Streptomyces*.

Le milieu ISP2 contenant 12 g/L d'agar en surfusion est pré-ensemencé avec le germe-cible par écouvillonnage en boîtes de Pétri, les souches tests ont été ensemencées sous la forme d'un tapis bactérien. Des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre. Par la suite, un volume de 100 µL de surnageant de culture à analyser (tubes de cultures agités en shaker), est prélevée stérilement puis introduite dans le puits; 2 mL de milieu de culture à partir de chaque tube est prélevés puis centrifugés à 5000 g dans des tubes Eppendorf.

Les boîtes de Pétri sont mises durant 2 heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 24 h.

3. Extraction des antibiotiques

L'extraction des antibiotiques à partir des filtrats de culture est réalisée à l'aide de divers solvants organiques, après une durée (définie lors de l'expérience précédente) correspondant à la production optimale de ces substances.

➤ Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Quatre solvants de polarité croissante sont testés (index de polarité): le *n*-hexane (00), le dichlorométhane (3,1), le *n*-butanol (4) et l'acétate d'éthyle (4,4). (Pour la souche A12 le dichlorométhane n'est pas été utilisé). Les cultures sont réalisées en milieux ISP2 pour la souche G46 et Bennett pour la souche A12.

Un volume de 100 mL de chaque milieu de culture est répartis dans des Erlenmeyer de 500 mL; (pH = 7,2, agitation de 150 rpm, température de 30°C). Au jour optimal de production d'antibiotiques, les filtrats sont répartis en 4 fractions de 25 mL extraites chacune avec 25 mL de solvant.

Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses, puis un passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) est réalisée afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles. Les extraits sont concentrés à sec puis repris dans du méthanol (1 mL) pour les phases organiques et dans l'eau distillée pour la phase aqueuse du *n*-butanol. Les extraits sont testés pour leur antagonisme par la méthode des disques de papier de 6 mm de diamètre.

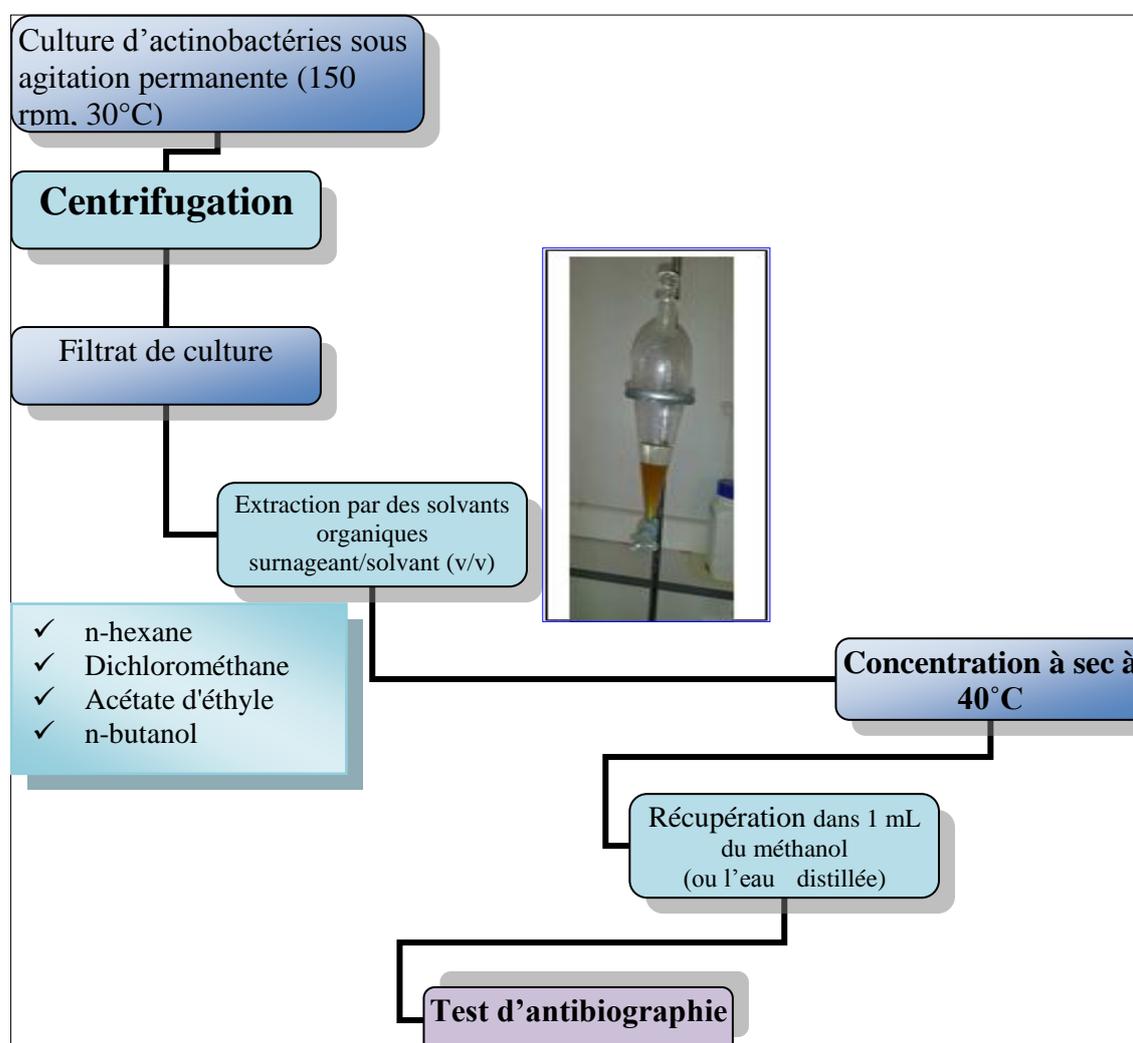


Figure 13. Protocole d'extraction des antibiotiques à partir de filtrat de culture.

4. Test d'antibiographie

Cette expérience nous permettra de connaître le meilleur solvant d'extraction pour la suite de notre travail. Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture sont testés contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932).

Les différents extraits organiques obtenus à partir des filtrats, ainsi que la phase aqueuse (du *n*-butanol) sont testés pour vérifier leurs activités antimicrobiennes. La méthode utilisée est celle des disques de papier.

Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 80 µL d'extrait à tester. Ils sont séchés pour faire évaporer le solvant, puis stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min. Les disques imprégnés sont ensuite déposés à la surface du milieu ISP2 contenant 12 g/L d'agar, pré-ensemencé avec le germe-cible et coulé en boîtes de Pétri. Les extraits sont testés contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932).

Celles-ci sont mises à 4°C pendant 2 heures avant d'être incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition après 24 heures d'incubation.

Partie III
Résultats et discussion

I. MISE EN EVIDENCE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE SUR MILIEUX SOLIDES

1. Antibiogramme des souches cible

Les résultats des antibiogrammes vis-à-vis les antibiotiques choisis : AMP, AMC, CL, CTX, CN, CIP sont effectués contre les 23 souches bactériennes cibles sont présentés dans le tableau 05.

Tableau 05. Résultats de l'antibiogramme des 23 souches bactériennes cibles.

Microorganisme	AMC		AMP		CIP		CTX		CN		CL	
	Diamètre d'inhibition	Résultat										
<i>K. pneumoniae</i> BLSE1	00	R	00	R	23	S	00	R	00	R	00	R
<i>K. pneumoniae</i> BLSE2	00	R	00	R	25	S	00	R	00	R	00	R
<i>K. pneumoniae</i> BLSE3	00	R	00	R	32	S	00	R	20	S	00	R
<i>E. coli</i> A	00	R	00	R	00	R	26	S	12	R	11	R
<i>E. coli</i> B	00	R	00	R	33	S	33	S	20	S	24	S
<i>E. coli</i> BLSE1	00	R	00	R	30	S	29	S	20	S	20	I
<i>E. coli</i> BLSE2	00	R	00	R	22	S	00	R	00	R	00	R
<i>E. coli</i> BLSE3	00	R	00	R	30	S	00	R	00	R	00	R
<i>M. morgani</i>	00	R	00	R	26	S	25	I	00	R	00	R
<i>P. mirabilis</i>	00	R	00	R	20	I	26	S	00	R	00	R
<i>P. aeruginosa</i> 1	00	R	00	R	34	S	34	S	22	S	25	S
<i>P. aeruginosa</i> 2	00	R	00	R	33	S	26	S	12	R	00	R
<i>Salmonella</i> sp.	00	R	00	R	21	S	32	S	12	R	24	S
Coliforme non déterminé	00	R	00	R	38	S	36	S	22	S	19	I

Tableau 05. Résultats de l'antibiogramme des 23 souches bactériennes cibles (suite)

Microorganisme	AMC		AMP		CIP		CTX		CN		CL	
	Diamètre d'inhibition	Résultat										
<i>S. aureus</i> (H)	23	R	25	R	36	S	24	S	28	S	24	R
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	00	R	00	R	32	S	21	R	00	R	00	R
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	00	R	00	R	33	S	20	I	24	S	00	R
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	08	R	14	R	36	S	31	S	24	S	23	S
<i>E. coli</i> (E52)	00	R	00	R	35	S	34	S	25	S	28	S
<i>S. aureus</i> (43300)	00	R	00	R	33	S	16	I	21	S	20	R
<i>S. aureus</i> (25923)	00	R	00	R	29	S	14	R	20	S	18	R
<i>S. aureus</i> (639c)	32	S	00	R	22	S	33	S	26	S	00	R
<i>S. aureus</i> (MRSA 2)	00	R	00	R	26	S	21	I	11	R	00	R
<i>S. aureus</i> (MRSA 3)	00	R	00	R	20	I	24	S	00	R	00	R

R = résistante, *S* = sensible, *I* = intermédiaire, (*H*) = origine hospitalier.

1.1. *Staphylococcus aureus*

La figure 14 montre les antibiogrammes obtenus des différentes souches de *Staphylococcus aureus*.

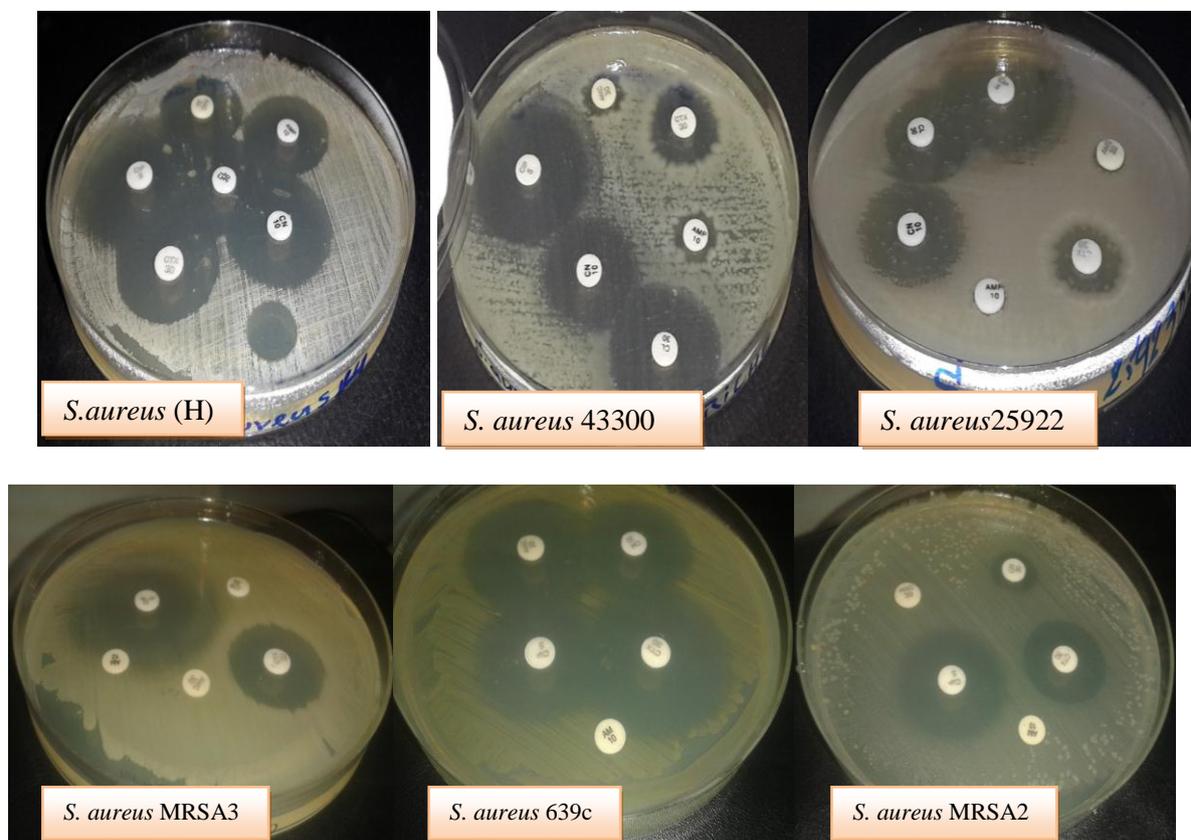


Figure 14. Antibiogramme des différentes souches de *Staphylococcus aureus*.

Les différentes souches de *Staphylococcus aureus* ont montrés une résistance vis-à-vis des différents antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines (l'ampicilline, l'amoxicilline + l'acide clavulonique et la cephalexine) sauf la souche de *Staphylococcus aureus* 639c qui paraît sensible à l'amoxicilline + l'acide clavulonique.

Une sensibilité est observée vis-à-vis un antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinolone (ciprofloxacine), un antibiotique de la famille des aminoglycoside de deuxième génération (gentamicine) et un antibiotique appartenant à la famille des céphalosporine de troisième génération (cefotaxime) sauf la souche de *S. aureus* 25922 qui apparaît résistante à cet antibiotique.

Ces résultats confirment la multirésistance des différentes souches *Staphylococcus aureus* étudiées.

1.2. Antibiogramme des autres souches à Gram négatif et à Gram positif

Les différentes souches à Gram négatif appariaient toutes résistantes vis-à-vis de deux antibiotiques appartenant à la famille des bêta-lactamines (l'ampicilline et l'amoxicilline + l'acide clavulanique), une résistance ou sensibilité plus ou moins importante est signalée pour les autres antibiotiques utilisés.

Les résultats complets avec les images de l'antibiogramme de différentes souches à Gram négatif sont donnés en annexe 01.

Ces résultats confirment la multi-résistance des différentes souches cible utilisés.

2. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide

2.1. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide d'A12

Le résultat positif est traduit par l'apparition d'une distance d'inhibition de la croissance de la souche bactérienne testée. Les résultats du test de la production des métabolites antibactériens par la souche A12 sur milieu solide sont représentés dans le tableau 06.

Tableau 06. Résultats du test de la production des métabolites antibactériens sur milieu solide de la souche A12

Bactérie test	Activité antibactérienne (distance d'inhibition en mm)			
	Après 24h		Après 48h	
	Culture de A12 âgée de 14 jours)	Culture de A12 âgée de 10 jours)	Culture de A12 âgée de 14 jours)	Culture de A12 âgée de 10 jours)
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	10	07	10	07
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	26	11	19	11
<i>Staphylococcus aureus</i> (43300)	27	08	25	08
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	24	12	24	09
<i>Staphylococcus aureus</i> (639c)	35	05	35	05
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA 2)	12	12	12	12

Les résultats des stries croisés sur milieu solide et l'activité antibactérienne de la souche de *Streptomyces* A12 contre plusieurs souches bactériennes sont montré dans les figures 15, 16, 17 et 18.

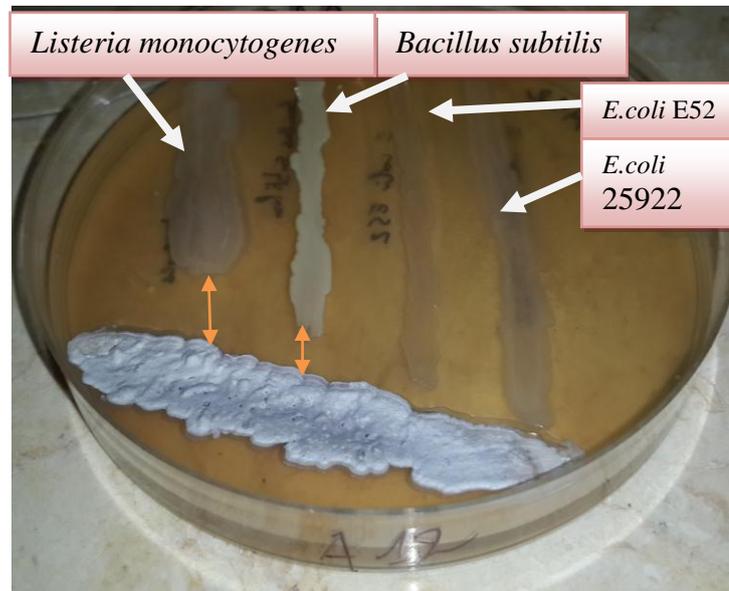


Figure 15. Activité antibactérienne de la souche A12 est observé contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (Culture de la souche A12 âgée de 10 jours).

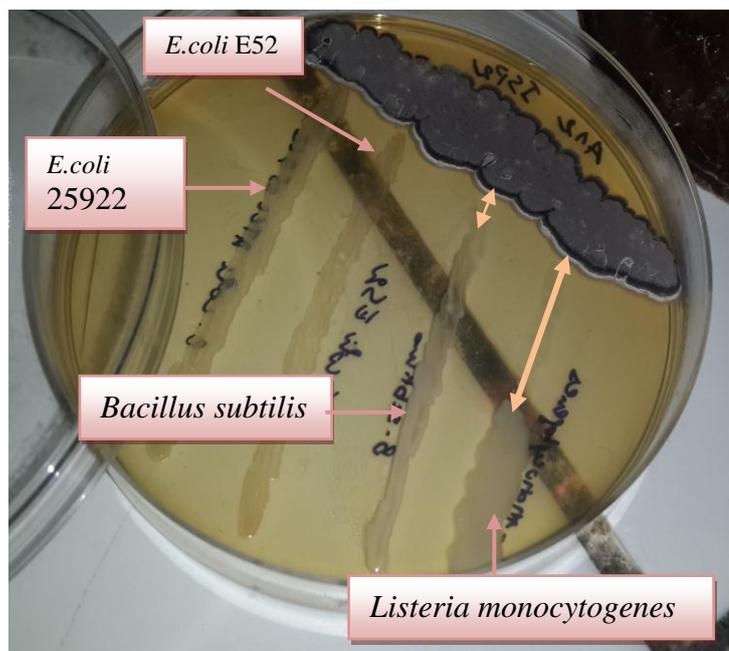


Figure 16. Activité antibactérienne de la souche A12 est observée contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) (Culture de la souche A12 âgée de 14 jours).

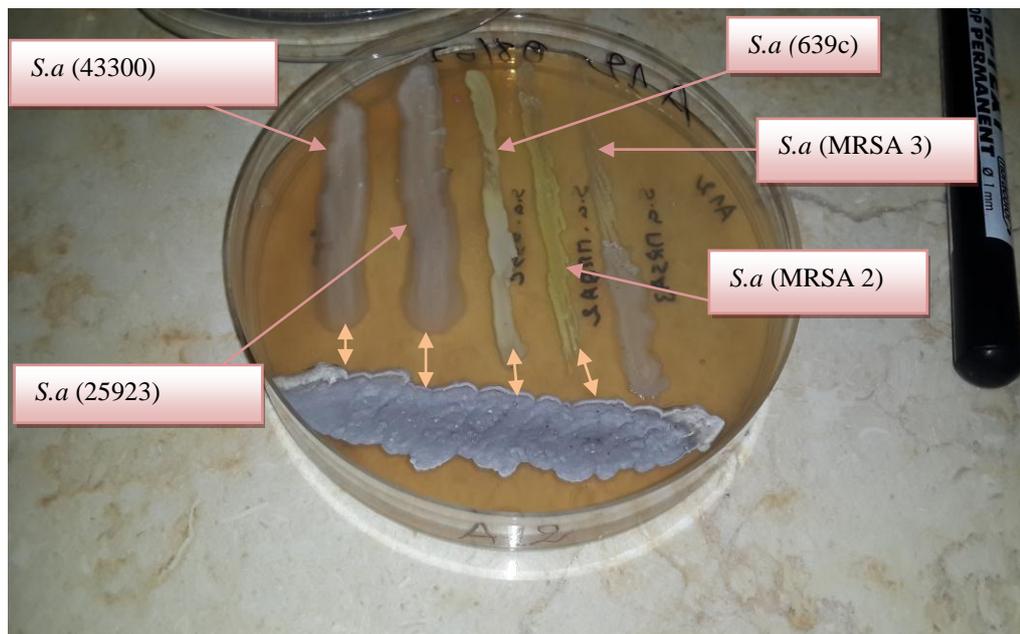


Figure 17. Activité antibactérienne de la souche A12 contre les différentes souches de *Staphylococcus aureus*.

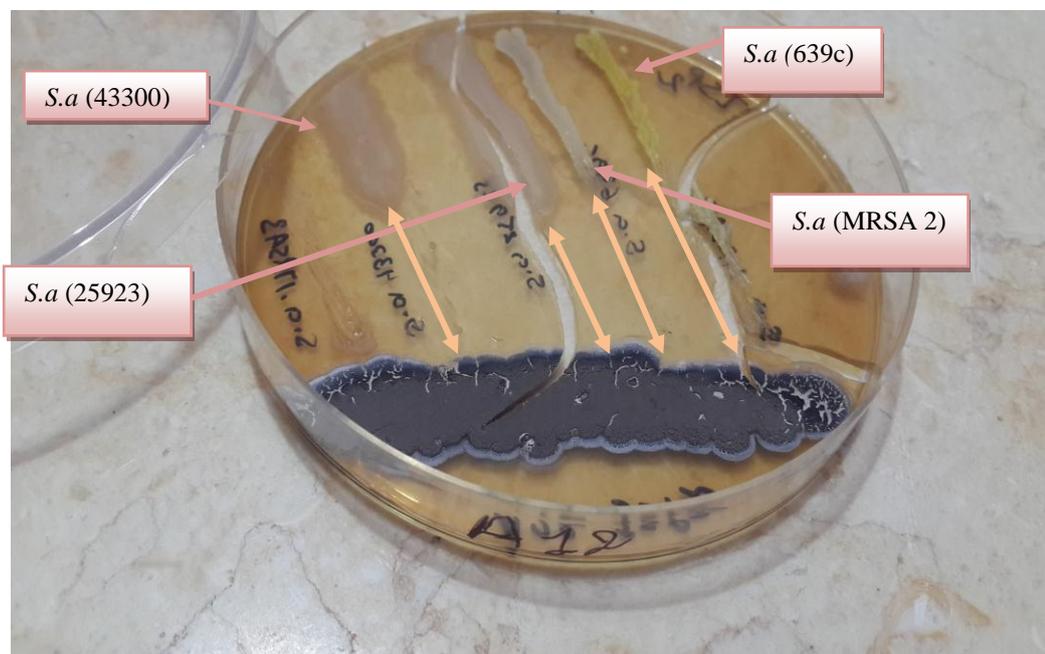


Figure 18. Activité antibactérienne de la souche A12 contre les différentes souches de *Staphylococcus aureus* (culture de la souche A12 âgée de 14 jours).

Les résultats du test de la production du métabolite antibactérien de la souche de *Streptomyces* A12 sur milieu solide (ISP2) ont montré :

- L'absence d'activité antibactérienne de la souche A12 sur la totalité des souches à Gram négatif et également contre la souche *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalier et *Staphylococcus aureus* MRSA 3.
- Une activité antibactérienne de la souche A12 (âgée 14 jours) plus ou moins importante sur les souches à Gram positif avec des zones d'inhibition variant de 10 mm à 35 mm de diamètre.
- Une activité antibactérienne plus ou moins faible de la souche A12 âgée 10 jours sur les souches cibles : *Staphylococcus aureus* (MRSA2), *Staphylococcus aureus* 639c, *Staphylococcus aureus*(43300) et *Staphylococcus aureus* (25922).

Ces résultats montrent que la souche A12 possède une activité antibactérienne moyenne contre les souches à gram positif, une activité forte est observée lors d'une culture âgée de 14 jours dont elle est maximale avec un diamètre de 35 mm contre *Staphylococcus aureus* 639c.

Sur le milieu ISP2, la sensibilité aux antibiotiques sécrétés par la souche A12 est notée chez les bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* MRSA2, *Staphylococcus aureus* (25922), *Staphylococcus aureus* 639c, *Staphylococcus aureus*(43300), *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Par contre, les bactéries à Gram négatif testées sont résistantes aux antibiotiques sécrétés par la souche de *Streptomyces* A12.

Ces résultats concordent avec ceux de Nalubega *et al.* (2016) et Nalubega (2016), dont l'activité antibactérienne d'A12 apparait importante contre les bactéries Gram positive (*Bacillus subtilis* ATCC 6633, *S. aureus* résistante à la méthicilline (MRSA) et *Staphylococcus aureus* 639c et absente contre les bactéries Gram négative testées (*Escherichia coli* ATCC 10536 et *Pseudomonas aeruginosa* CIP A22).

Ces résultats concordent aussi avec les résultats obtenus par plusieurs chercheurs (Herivony Onja *et al.*, 2016; Basilio *et al.*, 2003; Sacramento *et al.*, 2004; Oskay *et al.*, 2004) dont ils ont révélé que l'activité antibactérienne des actinobactéries et surtout les espèces de *Streptomyces* est

beaucoup plus importante contre les bactéries Gram positive que les bactéries Gram négative. Ceci est expliqué par la présence d'une membrane externe qui rend la cellule bactérienne Gram négative beaucoup moins perméable (Toussaint, 1996).

Ces résultats confirment que le sol d'Uganda et les régions à proximité constitue une source importante des nouvelles souches d'actinobactéries et particulièrement des *Streptomyces* qui ont une activité antibactérienne importante contre les bactéries Gram positive et qui peuvent être producteur des nouvelles molécules d'antibiotiques.

2.2. Test de l'activité antibactérienne sur milieu solide de G46

Les résultats du test de la production des métabolites antibactériens par la souche G46 sur milieu solide sont représentés dans le tableau 07.

Tableau 07. Résultats du test de la production des métabolites antibactériens sur milieu solide de la souche G46.

Bactérie test	Activité antibactérienne (en mm)	
	Après 24h	Après 48h
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	10	10
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	11	11
<i>Staphylococcus aureus</i> (43300)	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i> (25923)	10	10
<i>Staphylococcus aureus</i> (639c)	06	06
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA 2)	14	14

Les résultats des stries croisés sur milieu solide et l'activité antibactérienne de la souche de *Streptomyces* G46 contre plusieurs souches bactériennes sont montrés dans les figures 19, 20 et 21.

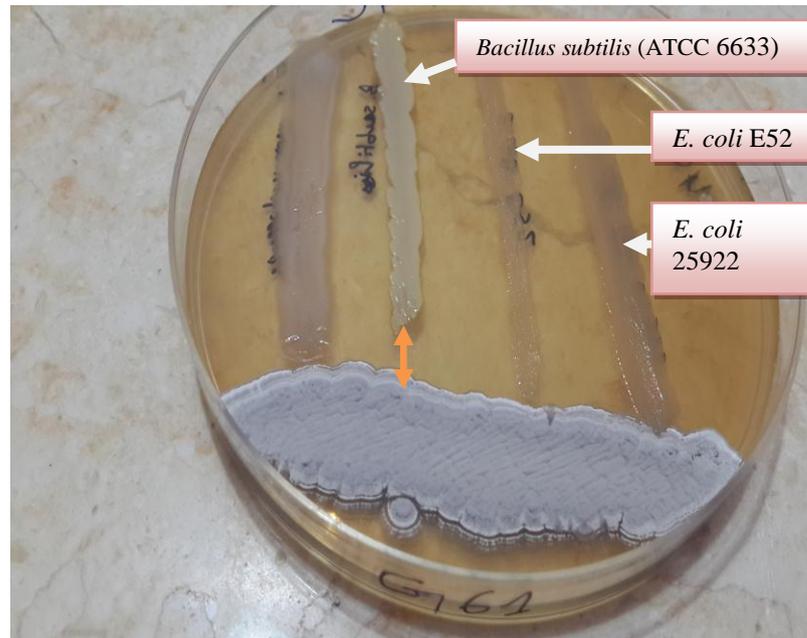


Figure 19. Activité antibactérienne de la souche G46 observée contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

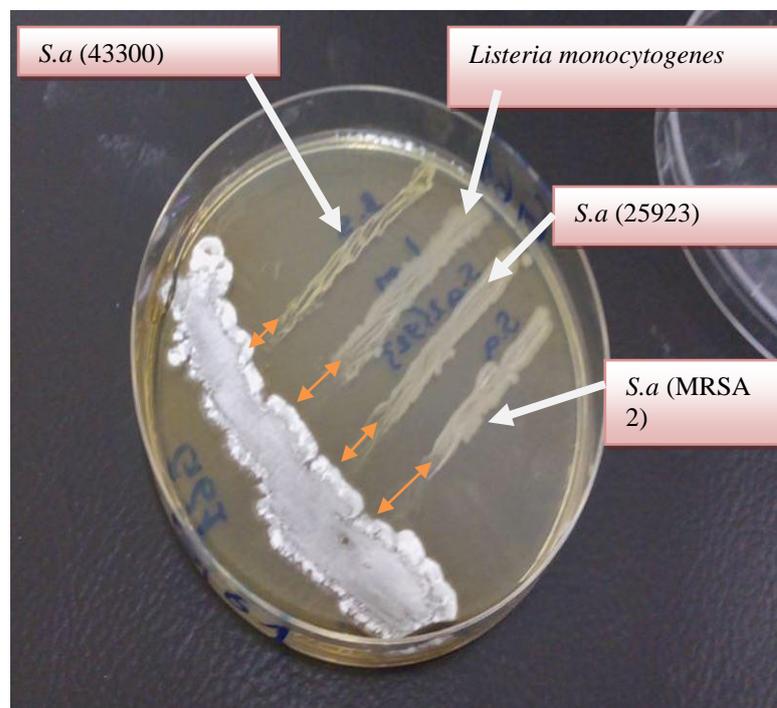


Figure 20. Activité antibactérienne de la souche G46 observée contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), *Staphylococcus aureus* (43300), *Staphylococcus aureus* (25923) et *Staphylococcus aureus* (MRSA 2).

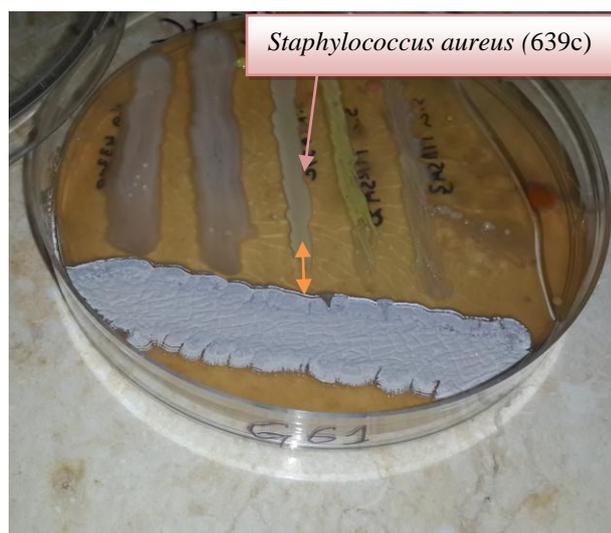


Figure 21. Activité antibactérienne de la souche G46 contre *Staphylococcus aureus* 639c

Les résultats du test de la production des métabolites antibactériens sur milieu solide (ISP2) par la souche G46 ont montré :

- L'absence d'activité antibactérienne de la souche G46 sur la totalité des souches à Gram négatif et la souche *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalier et *Staphylococcus aureus* MRSA 3.
- Une activité antibactérienne plus ou moins faible de la souche G46 sur les souches cibles à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (MRSA2), *Staphylococcus aureus* 639c, *Staphylococcus aureus* (43300), *Staphylococcus aureus* (25922), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932).

Ces résultats confirment les résultats obtenus par Toumatia (2010) dont l'activité antibactérienne des isolats appartenant au genre *Streptomyces* isolés à partir des sols sahariens est importante contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Listeria monocytogenes* CIP 82110.

Ces résultats confirment aussi les résultats obtenus par Aouiche (2010) où les bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) sont les plus sensibles aux antibiotiques des isolats appartenant au genre *Streptomyces* isolés à partir des palmeraies de la région de Ghardaïa.

Les résultats obtenus montrent que les sols de palmeraies en Algérie, constituent un écosystème particulier, renferment un potentiel assez riche en actinobactéries (Sabaou *et al.*, 1998) qui se sont révélés être de grands producteurs de nouvelles molécules antimicrobiennes (Zitouni *et al.*, 2005 et Boudjella *et al.*, 2006).

La figure 22 montre une comparaison de l'activité antibactérienne des deux souches de *Streptomyces* A12 et G46 contre les souches bactérienne test à Gram positif sensibilisés par celles - ci.

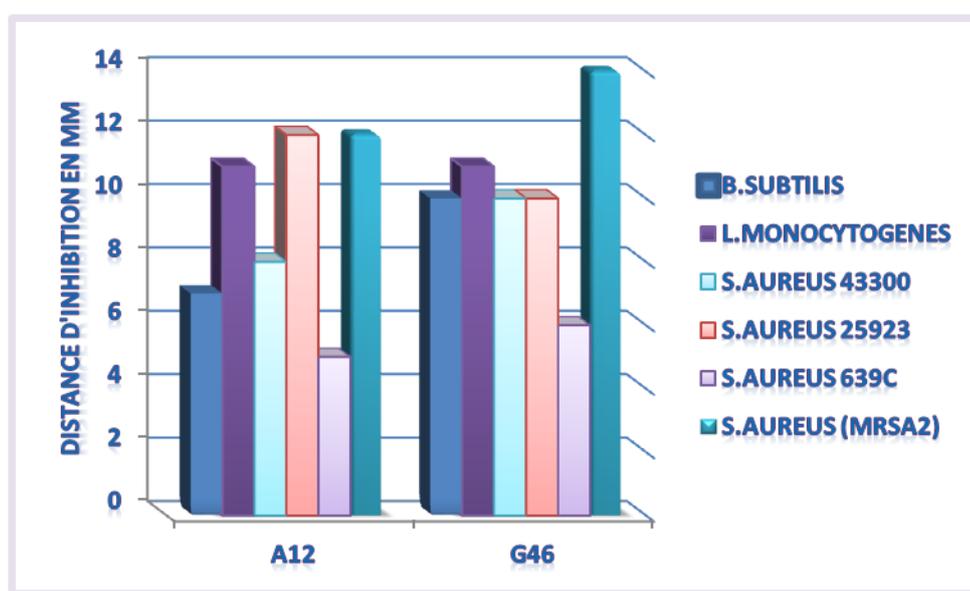


Figure 22. Activité antibactérienne des deux *Streptomyces* contre les bactéries à Gram positif (Culture de 10 jours).

Les deux souches de *Streptomyces* G46 et A12 ont une activité antibactérienne contre les mêmes bactéries testées à Gram positif. Cela peut être dû à la sécrétion des mêmes antibiotiques ou la sécrétion d'un antibiotique à large spectre d'action. En effet, la distance d'inhibition est directement proportionnelle à la concentration de l'antibiotique dans la culture bactérienne (Omura, 1992).

L'activité antibactérienne diffère d'une bactérie actinomycétale à l'autre et d'autre part que pour la même souche actinomycétale et sur le même milieu de culture, l'activité antibactérienne diffère d'une bactérie test à l'autre. Ces variations de résultats s'expliquent par le fait qu'une bactérie actinomycétale peut produire plusieurs types de molécules antibactériennes dont la nature dépend

de la composition et la concentration des composants du milieu de culture (Boughachiche *et al.*, 2005).

D'après Aharonowitz et Demain (1978) ; Omura et Tanaka (1986) ; Cheng *et al* (1995) ; Sanchez et Demain (2002), la nature et la concentration des composants du milieu de culture ont un effet remarquable sur la capacité et la quantité de métabolites secondaires produits par le microorganisme producteur.

II. ETUDE DES ANTIBIOTIQUES

1. cinétique de production en milieu liquide et test de l'activité de surnageant

L'activité antibactérienne est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) pour la souche G46. En revanche, la souche A12 est employée contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Staphylococcus aureus* 639c.

La cinétique de production des antibiotiques des deux souches de *Streptomyces* a été suivie durant 10 jours en milieu liquide agité (150 rpm, 30°C).

➤ Souche A12

Les résultats de la cinétique de production d'antibiotiques par la souche A12 sur le milieu liquide ISP2 et milieu Bennett sont montrés dans les Tableaux 8 et 9.

Tableau 08. Résultats de la cinétique de production de la souche A12 sur le milieu liquide ISP2.

Temps (par jours)	1 ^{er} jour	2 ^{eme} jour	3 ^{eme} jour	4 ^{eme} jour	5 ^{eme} jour	6 ^{eme} jour	7 ^{eme} jour	8 ^{eme} jour	9 ^{eme} jour	10 ^{eme} jour
Activité antibactérienne en mm										
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC 13932)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	24
<i>S.aureus</i> 639c	-	-	-	-	-	-	-	23	-	-

Tableau 09. Résultats de la cinétique de production de la souche A12 sur le milieu liquide Bennett.

Temps (par jours)	1 ^{er} jour	2 ^{eme} jour	3 ^{eme} jour	4 ^{eme} jour	5 ^{eme} jour	6 ^{eme} jour	7 ^{eme} jour	8 ^{eme} jour	9 ^{eme} jour	10 ^{eme} jour
Activité antibactérienne en mm										
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC 13932)	-	-	-	12	25	19	-	-	-	24
<i>S.aureus</i> 639c	-	-	-	20	25	21	-	15	-	25

La cinétique de production des antibiotiques de la souche A12 en milieu liquide Bennett est illustrée par les Figures 23 et 24. Les microorganismes-cibles choisis sont *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Staphylococcus aureus* 639c, lesquelles ont été inhibées sur milieu solide par la souche A12.



Figure 23. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche A12 (milieu Bennett) par la méthode des puits contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932) du jour 1 au jour 10.

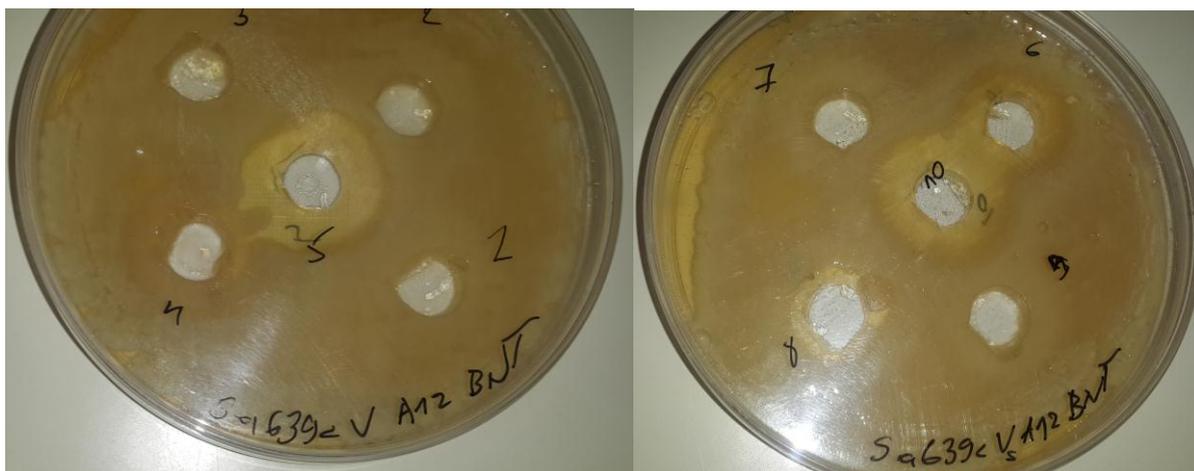


Figure 24. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche A12 (milieu Bennett) par la méthode des puits contre *S. aureus* 639c du jour 1 au jour 10.

La figure 25 montre la cinétique de production des activités antibactérienne de la souche de *Streptomyces* A12 obtenue en milieu liquide Bennett.

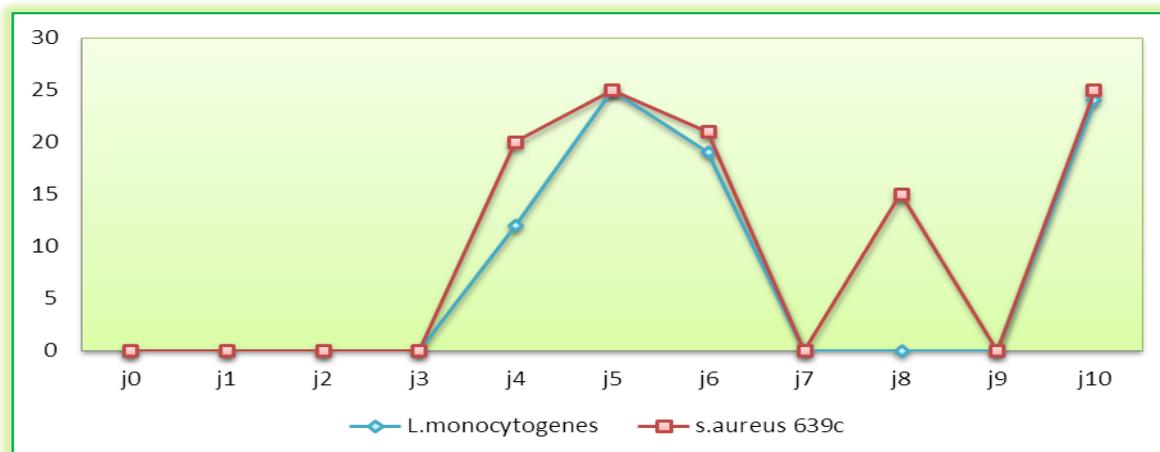


Figure 25. Cinétiques de production des activités antibactérienne d'A12 en milieu liquide Bennett contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932) et *S. aureus* 639c.

L'activité antibactérienne débute le 4^{ème} jour contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932) et *S. aureus* 639c. Elle est maximale durant la phase de déclin, entre les 6^{ème} et 10^{ème} jours. L'activité est meilleure contre *S. aureus* 639c.

Sur le milieu ISP2, l'activité antibactérienne a montré une seule zone d'inhibition observée le 10^{ème} jour contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932) et le 8^{ème} jour contre *S. aureus* 639c.

➤ **Souche G46**

Les résultats de la cinétique de production d'antibiotiques par la souche G46 sur deux milieux liquide : ISP2 et milieu Bennett sont montré dans les Tableaux 10 et 11.

Tableau 10. Résultats de la cinétique de production de la souche G46 sur le milieu liquide Bennett.

Temps (par jours)	1 ^{er} jour	2 ^{eme} jour	3 ^{eme} jour	4 ^{eme} jour	5 ^{eme} jour	6 ^{eme} jour	7 ^{eme} jour	8 ^{eme} jour	9 ^{eme} jour	10 ^{eme} jour
Activité antibactérienne en mm										
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC 13932)	-	-	-	-	-	-	12	11	13	-

Tableau 11. Résultats de la cinétique de production de la souche G46 sur le milieu liquide ISP2.

Temps (par jours)	1 ^{er} jour	2 ^{eme} jour	3 ^{eme} jour	4 ^{eme} jour	5 ^{eme} jour	6 ^{eme} jour	7 ^{eme} jour	8 ^{eme} jour	9 ^{eme} jour	10 ^{eme} jour
Activité antibactérienne en mm										
<i>L.monocytogenes</i> (ATCC 13932)	-	18	32	-	-	-	20	-	42	40

La cinétique de production des antibiotiques de la souche G46 en milieu liquide ISP2 est illustrée par la Figure 26 et 27. Le microorganisme-cible choisi est *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932), laquelle a été inhibées sur milieu solide par la souche G46.

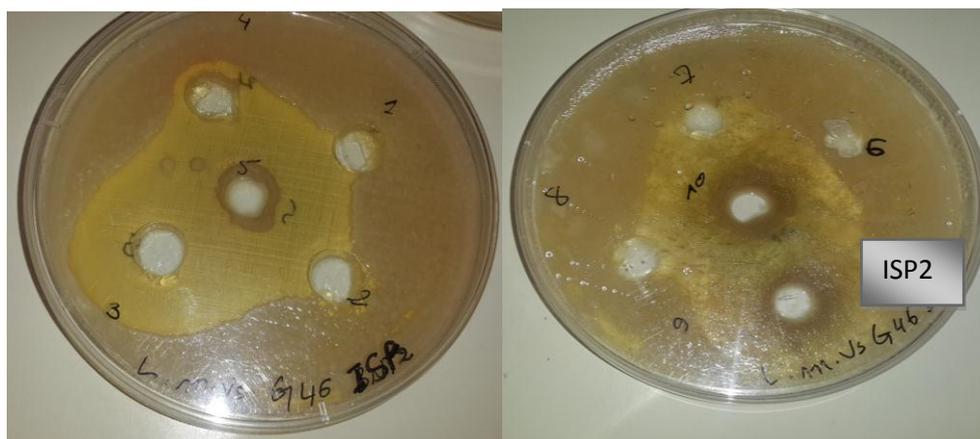


Figure 26. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche G46 par la méthode de diffusion sur puits (milieu ISP2) contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932) du jour 1 au jour 10.

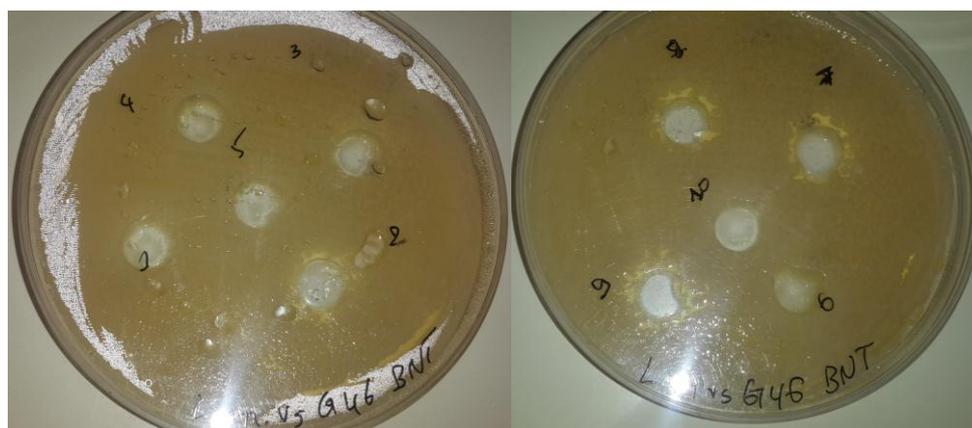


Figure 27. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche G46 par la méthode de diffusion sur puits (milieu Bennett) contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932) du jour 1 au jour 10.

La figure 28 montre la cinétique de production des activités antibactérienne de la souche de *Streptomyces* G46 obtenue en milieu liquide ISP2 contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932).

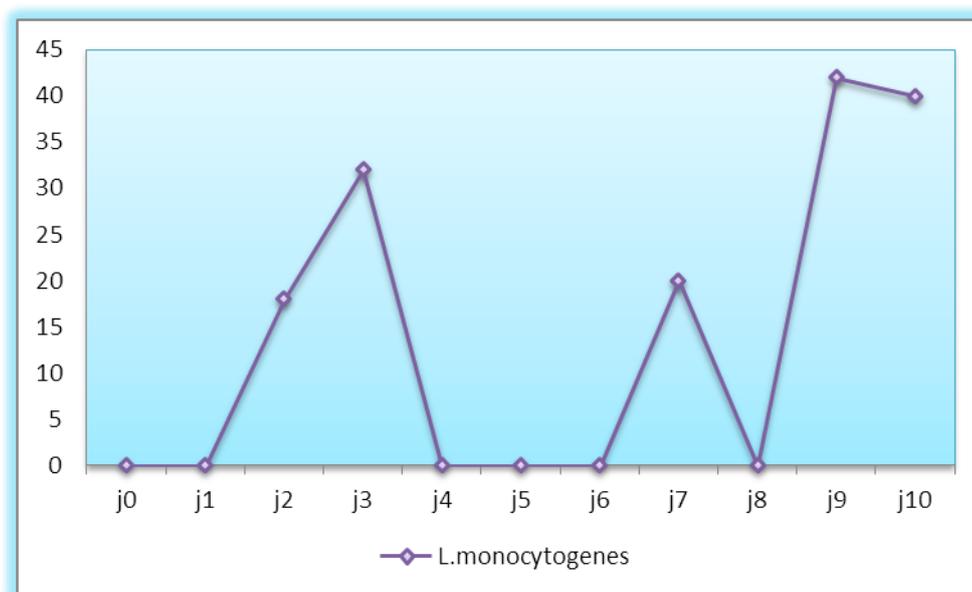


Figure 28. Cinétiques de production des activités antibactérienne de G46 en milieu liquide ISP2.

Sur le milieu ISP2 l'activité antibactérienne débute le 2^{ème} jour contre *L. monocytogenes* (ATCC 13932). Elle est maximale dans le 3^{ème} jour (diamètre de zone d'inhibition de 32 mm), entre les 6^{ème} et 10^{ème} jours l'activité antibactérienne poursuit et devient maximale encore une fois durant la phase de déclin entre le 9^{ème} et le 10^{ème} jour.

Sur le milieu Bennett L'activité antibactérienne a montré des zones d'inhibition entre le 7^{ème} et le 9^{ème} jour avec des zones d'inhibition variant de 11 à 13 mm.

Les courbes de suivi des activités, présentent deux à trois maxima. Ceci peut être expliqué par la production de plusieurs antibiotiques ou complexes d'antibiotiques qui seraient soit des dérivés proches, comme c'est souvent le cas, soit des groupes d'antibiotiques différents à spectres d'activité différents (Toumatia, 2010).

La cinétique de production des antibiotiques a été menée en conditions liquides en agitation sur deux milieux complexes, ISP2 et Bennett, qui ont déjà été utilisés pour ce genre d'étude et sont connus pour être favorables à la production d'antibiotiques (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007). Les deux milieux, par leur richesse en nutriments, sont montrés différents entre eux pour la production des antibiotiques par les deux souches étudiées.

Le développement d'un germe test, ensemencé dans la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice qui est matérialisée par une zone translucide au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique.

Le choix du meilleur milieu de production peut être s'expliqué sur deux niveaux :

Quantitativement, les résultats du tableau 08 et 09 montrent que les diamètres des zones d'inhibition importantes sont obtenus avec les surnageant prélevés à partir du milieu de culture de Bennett pour la souche A12 (25 mm). Ceux du milieu de culture ISP2 sont obtenus en un seul jour pour les deux bactéries testés. Pour la souche G46, les diamètres des zones d'inhibition importantes sont obtenus avec les surnageant prélevés à partir du milieu de culture ISP2. Pour cette même souche, une autre production maximale d'antibiotiques est observée en fin de phase de déclin (du 8^{ème} au 10^{ème} jour) avec un maximum le 9^{ème} jour (diamètre de 42 mm), ceci est expliqué par la production d'un nouveau antibiotique différent à celui produit dans la phase exponentielle.

Les jours dont l'activité antibactérienne est nulle peuvent être expliqués par le non-respect des conditions de fermentation (culture en tubes à la place des cultures en Erlenmeyer non disponible dans la période de réalisation d'expérimentation).

Qualitativement, le milieu de culture Bennett permet la production d'une large variété d'antibactériens au moins deux (le cinquième jour pour le premier produit et le dixième jour pour l'autre concernant la souche A12).

Le milieu ISP2 permet aussi cette production du fait qu'il contient une source de carbone (le glucose), ce dernier représente la meilleure source de carbone pour la production d'antibiotique selon les résultats rapportés par Anurag *et al.* (2005).

Les résultats obtenus font ressortir le milieu de Bennett comme le meilleur milieu de production d'antibactériens pour la souche de *Streptomyces* A12 (jour optimale de production d'antibiotiques est le 5^{ème} jour) et le milieu ISP2 pour la souche G46 du point de vue quantitative (jour optimale de production d'antibiotiques est le 3^{ème} jour).

La comparaison des zones d'inhibition des deux souches de *Streptomyces*, A12 et G46, sur milieu liquide a montré que la production du métabolite antibactérien est plus importante sur le milieu liquide que sur le milieu solide, ceci s'accorde avec les résultats de plusieurs chercheurs (Zitouni, 2005; Melouli, 2003; Hilali, 2002; Slavica, 2005) qui ont montrés que la production d'antibiotique est meilleur sur le milieu de culture liquide.

2. Tests de l'activité antibactérienne à partir des extraits du filtrat de culture

Après avoir déterminé le jour optimal de production d'antibiotiques par les deux souches de *Streptomyces*, l'étape suivante sera de laisser les *Streptomyces* produire les antibiotiques jusqu'à ce jour optimal, de les extraire par divers solvants organiques et de déterminer le meilleur solvant d'extraction par antibiographie contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932).

Le principe de l'extraction par les solvants organiques se résume en une séparation du surnageant en deux phases, une phase organique et une phase aqueuse, et de faire passer les molécules bioactives dans la phase organique.

Les résultats des tests de l'activité antibactérienne des extraits à partir du filtrat de culture sont représentés dans le tableau 12.

Tableau 12. Résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits du filtrat de culture

Souches de <i>Streptomyces</i>	Activité anti bactérienne (en mm) contre <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932)	
	A12	G46
Souche cible		
Solvants Organiques		
n- hexane	Activité antibactérienne nulle (0 mm)	Activité antibactérienne nulle (0mm)
Dichlorométhane	-	Activité antibactérienne faible (8,5 mm)
n- butanol (phase aqueuse)	Activité antibactérienne nulle (0 mm)	Activité antibactérienne nulle (0 mm)
n- butanol (phase organique)	Activité antibactérienne faible (12,5 mm)	Activité antibactérienne nulle (0 mm)
acétate d'éthyle	Activité antibactérienne moyenne (19,5 mm)	Activité antibactérienne forte (18,5 mm)

Note : tous les essais sont faits en deux répétitions et la moyenne est calculée.

Les résultats obtenus concernant les zones d'inhibitions de l'extrait du filtrat de culture par le solvant l'acétate d'éthyle est présenté dans la figure 29.



Figure 29. Zones d'inhibition des extraits du filtrat de culture de l'acétate d'éthyle à partir de G46 contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932).

L'extraction effectuée à l'aide de solvants non miscible à l'eau est de polarités différentes (Zitouni *et al.*, 2005; Badji *et al.*, 2005; Boughachiche, 2012) montre que l'activité antibactérienne de la souche de *Streptomyces* G46 contre la souche bactérienne *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) est meilleure avec l'acétate d'éthyle (18,5 mm), faible avec le dichlorométhane et nulle avec le n-hexane et le n-butanol. Pour la souche de *Streptomyces* A12 cette activité est meilleure avec l'acétate d'éthyle (19,5 mm), faible avec le n-butanol et nulle avec le n-hexane.

Les résultats obtenus montrent que les substances antibactériennes ont été concentrées dans la phase organique qui a entraîné l'inhibition de la croissance de la souche bactérienne *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932). Le meilleur résultat est obtenu en utilisant l'acétate d'éthyle pour l'extraction des molécules bioactives.

Conclusion et perspectives

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ces bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure.

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'hôte semble toujours indispensable. Les actinobactéries et surtout les souches et les espèces de *Streptomyces* sont d'importants producteurs d'antibiotiques et d'autres métabolites secondaires (Belyagoubi, 2014).

Dans ce travail nous avons étudié l'activité antibactérienne de deux nouvelles souches d'actinobactérie du genre *Streptomyces* nommées A12 et G46. Les tests représentant les propriétés antagonistes des deux souches *Streptomyces* sur le milieu de culture solide ISP2 contre vingt-trois (23) souches tests dont huit Bactéries à Gram positif et quinze à Gram négatif (résistantes toute a des antibiotiques de la famille des bêta-lactamines et ont également une résistance différentielle vis-à-vis autres antibiotiques testés). Les résultats montrent que les deux souches ayant une activité antibactérienne contre six bactéries Gram positive et n'ayant aucune activité contre toutes les bactéries Gram négative et deux bactéries Gram positive (*Staphylococcus aureus* MRSA 3 et *Staphylococcus aureus* d'origine hospitalier).

Afin de déterminer le jour optimal de production de molécules antibactériennes, la cinétique de production des celles-ci est suivi pour les deux souches de *Streptomyces* pendant 10 jours sur les deux milieux de culture liquides Bennett et ISP2. Nous avons constaté que la production est meilleure sur le milieu ISP2 pour la souche G46 (le maximum de production est enregistré le 3^{ème} jour avec une zone d'inhibition de 32 mm, le 9^{ème} et le 10^{ème} jour avec des zones d'inhibition respectivement de 42 et de 40 mm, contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932). Pour la souche A12 l'activité est meilleure sur le milieu Bennett (le maximum de production est enregistré le 5^{ème} jour avec une zone d'inhibition de 25 mm contre *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) et *Staphylococcus aureus* 639c.

Après la détermination de meilleur jour de production de molécules antibactériennes l'extraction des métabolites antibactériens est procédé à partir du filtrat de culture des deux souches de *Streptomyces* en milieu liquide et en utilisant des solvants organiques de polarités différentes. Le test de l'activité de ces extraits sur la souche test *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) a montré que l'activité antibactérienne de la souche G46 est meilleure avec l'acétate d'éthyle (18,5 mm),

faible avec le dichlorométhane (8,5 mm) et nulle avec le n-hexane et le n-butanol. Pour la souche A12 cette activité est meilleure avec l'acétate d'éthyle (19,5 mm), faible avec le n-butanol et nulle avec le n-hexane.

Plusieurs prospectives peuvent être envisageables :

- ✓ L'optimisation de la production en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources de carbone et azotées, élément minéraux, température, aération et pH) par la recherche des meilleures conditions (sources de carbone et azotées, élément minéraux, température, aération et pH).
- ✓ La séparation des produits de l'extrait d'acétate d'éthyle du filtrat de culture par chromatographie sur couche mince à gel de silice, la détermination leur nombre et connaître leur polarité et leur rapport frontal .il serait intéressant de tester ces produits contre d'autres bactéries cibles par ces produit et révéler ceux qui sont actifs.
- ✓ La purification par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).
- ✓ La détermination de la structure chimique des molécules antibactériennes.
- ✓ La réalisation des tests antagonistes contre de nombreux germes pathogènes à l'homme et l'évaluation de la toxicité de l'antibiotique synthétisé envers ces organismes afin de savoir s'ils sont potentiellement intéressants dans le domaine pharmaceutique.
- ✓ La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).
- ✓ Tester les autres activités biologiques des métabolites secondaires des deux souches.

Références bibliographiques

- Aharonowitz Y., Demain A.L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 14, 159- 164.
- Alekshun Michael N., Levy S.B. (2007). Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *J. Cell*, 128 (6), 1037-1050.
- Alexander M. (1977). Introduction to soil Microbiology. Krieger Publishing Company, Malabar, 467-468.
- Anurag P., Anupam S., Majumdar S.K. (2005). Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M27 for the production of antibacterial antibiotic. *African Journal of biotechnology*, 4, 909-910.
- Aouiche A. (2010). Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Mémoire Magistère. Université Djillali Liabes. Sidi-Bel-Abbes.
- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005). Activité Antifongique d'une Souche d'*Actinomyces* d'Origine Saharienne sur Divers Champignons Pathogènes et Toxinogènes. *Jornal de Mycology Médicale*, 15, 211-219.
- Badji B. (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomyces* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou ,226 p.
- Barrett D. (2002). From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica Biophysica Acta*, 1587, 224-233.
- Basilio A., González I., Vicente M.F., Gorrochategui J., Cabello A., González A., Genilloud O. (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol*, 95, 814-823.

- Belyagoubi L. (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen, p144.
- Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics*, 58, 1-26.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. (2004). Vol. 4. Garrity GM., Bell JA., Lilburn TG. (Eds.). Williams and Wilkins Co, Baltimore, p 401.
- Breton A., Theilleux J., Sanglier J.J., Vobi G. (1989). Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In: Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent JP., Sanglier JJ. (Eds).Paris, Masson, 33-70.
- Boudjella H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des Streptosporangium des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El Harrach, p188.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of Streptosporangium Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiological Research*, 161 (4), 288-298.
- Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A., Boulahrouf A. (2005). Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkhha de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C*, 23, 5-10.
- Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Boulahrouf A. (2012).Activité antibactérienne d'espèces rares de Streptomyces contre des isolats cliniques multirésistants. *Ann Biol Clin* ,70(2), 169-74
- Bousseboua H. (2002).Element de microbiologie générale. Edition de Université Mentouri de Constantine,p 17.

- Cattoir V. (2004). Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie*, 52, 607–616.
- Cavallo J.D. (2004). Betalactamines, Elsevier, 130-180.
- Cheng J.R., Fang A., Demain A.L. (1995). Effect of amino acids on rapamycin biosynthesis in *Streptomyces hygroscopicus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 43, 1096-1098.
- Demain A.L. (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind. Microbiol. Biotechnol*, 33, 486-495.
- Euzéby J.P. (2017). List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/s/streptomycesa.html>.
- George M., Anjumol A., George G., Mohamed Hatha A.A. (2012). Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr J Microbiol Res*, 6, 2265-2271.
- Goodfellow M., Trujillo M.E. (2012). Family I. *Actinopolysporaceae*. In: Goodfellow M., Kämpfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Suzuki KI., Ludwig W., Whitman WB (Eds) Bergey's manual of systematic bacteriology, vol 5. *Springer*, New York, Dordrecht, Heidelberg, London, 163-170.
- Graybill J.R., Tollemer J., Torres Rodriguez J.M. (2000). Antifungal compounds: controversies, queries and conclusions, *Med. Mycol*, 1, 323-333.
- Groth J., Vettermann R., Schutze B., Shumann P., Saiz Jimenz C. (1999). Actinomycete in Karstic caves of northern Spain. *J Microbiol method*, 36, 115- 122.
- Fisher A., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. (1983). Molecular genetic and chemotaxonomic studies on *Actinomadura* and *Nocardiopsis*. *J. Gen. Microbiol*, 129, 3433-3446.
- Genilloud O., GonzalezI., Salazar O., Martin J., Tormo J.R., Vicente F. (2011). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*, 38, 375-389.

- Hilali L., Hattabi A., Nssarlah N., Malki A., Finance C.(2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycétales productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel Marocain. *Rev Biol Biotech*, 2,49-53.
- Hopwood D. (2007) An introduction to the actinobacteria. *Microbiology Today*: 60-61. (www.microbiologybytes.wordpress.com).
- Hashizume H., Adachi H., Igarashi M., Nishimura Y., Akamatsu Y. (2010). Biological activities of pargamicin A, a novel cyclic peptide antibiotic from *Amycolatopsis* sp., *J. Antibiot.*, 63, 279-283.
- Haste N.M, Perera V.R., Maloney K.N., Tran D.N., Jensen P., Fenical W., Nizet V.(2010). Activity of the streptogramin antibiotic etamycin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *J. Antibiot*, 63, 219-224.
- Herivony Onja A., Rado R., Rahanira R., Rigobert A., Marson R., Fidèle R.(2016). Biological Potentials of Ginger Associated Streptomyces Compared with Ginger Essential Oil. *American Journal of Life Sciences*. Vol. 4, 6, 152-163.
- Hodgson D.A. (2000). Primary metabolism and its control in Streptomyces: a most unusual group of bacteria. *Adv Microb Physiol*, 42, 47-238.
- Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994). In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Hopwood D.A. (1999). Forty years of genetic with *Streptomyces*: from *in vivo* through *in vitro* to *in silico* (review article). *Microbiology*, 145, 2183-2202.
- Junker B., Walker A., Hesse M., Lester M., Christensen J., Connors N .(2009). Actinomycetes scale up for the production of antibacterial nocathiacin. *Biotechnol.Prog*, 25, 176-188.
- Kerbab S. (2012). Les actinomycètes d'un sol salé: rôle des osmoprotecteurs naturels. mémoire de Magistère en Génie Microbiologique, Université Ferhat Abbas de Sétif.

- Korn Wendisch F., Kutzner H. J. (1992). The family *Streptomycetaceae*, In: Balows A., Truper H.G., Dworkin M., Harder W., Schleifer K.H. The Prokaryotes. *Springer Edition New York*, 921-995.
- Kurtz M.B. (1998). New antifungal drug targets: a vision for future. *A. S. M. News*, 31-64.
- Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. p186.
- Lechat P., Calvo F., de Cremoux P., Giroud J.P., Logier G., Lechat P., Rouveix B., Weber S. (1990). *Pharmacol Méd Masson* 5^{ème} Edition, 114-190.
- Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). *Biotechnologie des antibiotiques*. Masson, Paris, p 481.
- Lavigne J.P. (2007). Effet des antibiotiques et mécanismes de résistance. Cours de bactériologie. Faculté de Médecine Montpellier-Nîmes.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 78, 399-405.
- Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1970). Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales. Prauser H.(Eds.) G. *Fisher Verlag, Jena*, 311-316.
- Locci R., Sharples, G.P. (1984). Morphology. In: "The biology of Actinomycetes". Goodfellow M., Mordarski M., Williams S.T. Eds. *Academic Press*, London, 1, 65 - 199.
- Madigan M.T., Martinko J.M. (2007). *Biologie des microorganismes*. *Pearson Education France*, 11^{ème} édition, 331-423, 686-718.

- Mallié M., Bastide J.M. (2001). Les nouveaux antifongiques et leurs stratégies de recherche. *Revue Française des Laboratoires*, 332, 63-70.
- Mellouli L., Ameur Mehdi R.B., Sioud S., Salem M., Bejar S. (2003). Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Res. Microbiol*, 154, 345-352.
- Metzger R., Bonatti H., Sawyer R. (2009). Future trends in the treatment of serious gram-positive infections, *Drugs Today (Barc)*, 45, 33-45.
- Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman., C.A., Fenical W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Environ Microbiol*, 68, 5005-5011.
- Miyadoh S., Amano S., Tohyama H., Shomura T. (1990). A taxonomic review of the genus *Microbispora* and a proposal to transfer two species to the genus *Actinomadura* and to combine ten species into *Microbispora rosea*. *J. Gen. Microbiol*, 136 (9), 1905-1913.
- Mahmoudi M.A., Massen A. (2013). Evaluation de l'antibiothérapie probabiliste chez les enfants hospitalisés dans le service de pédiatrie et des UMCp de l'EHS (mère et enfant) de Tlemcen .memoire de docteur en pharmacie, Université ab ou bekr b elkaïd , Telemcen.
- Mora Duarte J., Betts R., Rotstein C., Colombo A.L., Thompson Moya L., Smietana J., Lupinacci R., Sable C., Kartsonis N., Perfect J. (2002). Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. Caspofungin invasive candidiasis study group. *N. Engl. J. Med*, 347 (25), 2020-2029.
- Ochi K., Haraguchi K., Miyadoh S. (1993). A taxonomic review of the genus *Microbispora* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 43, 58-62.

- Oiwa R. (1992) .Antibacterial agents, *In: Omura S. The search for bioactive compounds from microorganisms. Spring-Verlag, New York, 1-29.*
- Okami Y., Hotta K. (1988). Search and discovery of new antibiotics. *In: M. Goodfellow, S.T.Williams and M. Mordarski (eds.) Actinomycetes in Biotechnology. Academic Press, New York, 33-67.*
- Omura S. (1992). The expanded horizon for microbial metabolites. *Gene, 115,141-149.*
- Omura S., Tanaka J. (1986). Biosynthesis of tylosine and its regulation by ammonium and phosphate. *In: Kleinkauf H., Von Dohren. H, Dormaner H., Nesmann G. Regulation of secondary metabolites. VCH Publishers Inc. Berlin, 306-332.*
- Oskay M., Tamer A.U., Azeri C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *African Journal of Biotechnology, 3 (9),441-446.*
- Perry J.J., Staley J., Lory S. (2004). *Microbiologie. Eds Dunod. Paris.*
- Perronne C. (1999). *Maladies infectieuses, volume 1, p65.*
- Rajan B.M., Kannabiran K. (2010). Antimicrobial activity of *Streptomyces albofaciens vitbrk1* spp. isolated from the bay of Bengal coast of Tamil Nadu, India. *Pharmacologyonline, 1, 124-132.*
- Rheims H., Felske A., Seufert S., Stackebrandt S. (1999). Molecular monitoring of an uncultured group of the class *Actinobacteria* in two terrestrial environments. *Journal of Microbiological Methods, 36 (1-2), 65-75.*
- Roh H., Uguru G.C., Ko H.J., Kim S., Kim B.Y., Goodfellow M. (2011). Genome sequence of the abyssomicin and proximycin-producing marineactinomycete *Verrucosispora maris* AB-18-032. *J. Bacteriol, 193, 3391-3392.*

- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Bennadji H. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9 (2).
- Sabaou N. (1988). Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger, p192.
- Sacramento D.R., Coelho R.R.R., Wigg M.D., Linhares L.F.T.L., Santos M.G.M., Semêdo L.A.S., Silva A.J.R. (2004). Antimicrobial and antiviral activities of an actinomycete (*Streptomyces* sp.) isolated from a Brazilian tropical forest soil. *World J. Microbiol. Biotechnol*, 20, 225-229.
- Sanchez S., Demain A.L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology*, 31, 895-906.
- Stackebrandt E., Woese C.R. (1981). The evolution of prokaryotes. *Symposia of the Society for General Microbiology*, 32, 1-31.
- Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward Rainey N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol*, 47 (2), 479-491.
- Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M. (1987). Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Syst. Appl. Microbiol*, 9, 110-114.
- Stackebrandt E., Schumann P. (2006). Introduction to the Taxonomy of Actinobacteria, In: Dworkin M., Falkow S., Rosenberg E., Schleifer K., Stackebrandt E. *Prokaryotes*. Springer Science, Business Media, LLC edition New York, USA: 297-321.
- Smith A.L., Erwin, A.L, Kline T., William C.T., Unrath K.N., Weber A., Howald W.N. (2007). Chloramphenicol is a substrate for a novel nitroreductase pathway in *Haemophilus influenzae*. *Antimicrob. Agents Chemother*. 51, p. 2820-2829.

- Stackebrandt E., Rainey F.A., WardRainey N.L. (1997). A proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int. J. syst. Bacteriol*, 47, 479-491.
- Slavica B.L., Sandra S., Konstantinovic., Zoran B.(2005). UV/VIS Analysis and Antimicrobial Activity of Streptomyces Isolates, *Medicine and Biology*, Vol. 12, 44-46.
- Solecka J., Zajko J., Postek M., Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol*,7, 373-390.
- Takeuchi T., Hara T., Naganawa H., Okada M., Hamada M., Umezawa H., Gomi S., Sezaki M., Kondo S. (1988). New antibiotics, benanomicins A and B from an actinomycete. *J. Antibiotics*, 41, 807-811.
- Theilleux J. (1993) *Microbiologie industrielle: les actinomycetes Lavoisier*, 425-479.
- Toumatia O. (2010). Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger, p61.
- Toussaint V. (1996). Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycete EF76 antagoniste à *Phytophthora fragariae* var .Rubi causant le pourridié des racines du framboisier. mémoire de maître ès des sciences. Université de sherbrooke, Quebec, Canada, p52.
- Walsh T.J., Jackson A.J., Lee J.W. Amantea M., Sein T., Bacher J., Zeck L. (2000). Dosedependent pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in rabbits. *Antimicrob. Agents Chemother*, 44 (8), 2068-2076.
- Uchida A., Seino A. (1997) Intra and inter generic relationships of various actinomycete strains based on the acyl types of the muramyl residue in cell wall peptidoglycane examined in glycolate test. *Int J Syst Bacteriol*, 47,182-190.

- Villalobos M., Struelens B., Glupczynski, C. Berhin, H. (2006) . P1355 Epidemiology of extended spectrum β -lactamase-producing Enterobacteriaceae in Belgium: preliminary results of a national multicentre survey in 2006.
- Yala D., Merad A.S., Mohamedi D., Ouar Korich M.N. (2001). Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91, 5-12.
- Zitouni A. (2005). Taxonomie et antibiotiques des Saccharothrix et des Nocardiosis des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par Saccharothrix sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, p230.
- Zitouni A., Bodjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005). Nocardiosis and Saccharothrix Genera in Saharan Soils in Algeria: Isolation, Biological Activities and Partial Characterization of Antibiotics, *Research in Microbiology*, 156, 984-993.
- Zouaghi A. (2007). Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par Streptomyces rimosus. Diplôme National d'Ingénieur. Université 7 Novembre de Carthage.
- URL 01 : www.microbe-edu.org
- URL 02: www.eucast.org (The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Routine and extended internal quality control for MIC determination and disk diffusion as recommended by EUCAST. Version 6.1, 2013.

Annexes

Annexe 01 : Figures d'antibiogramme des souches test

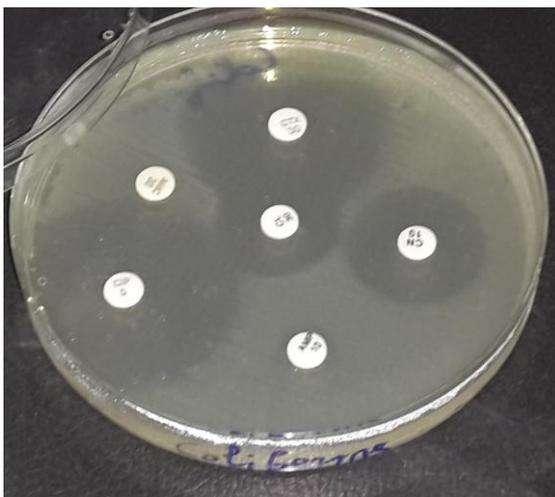


Figure 01. Antibiogramme de coliforme non déterminée

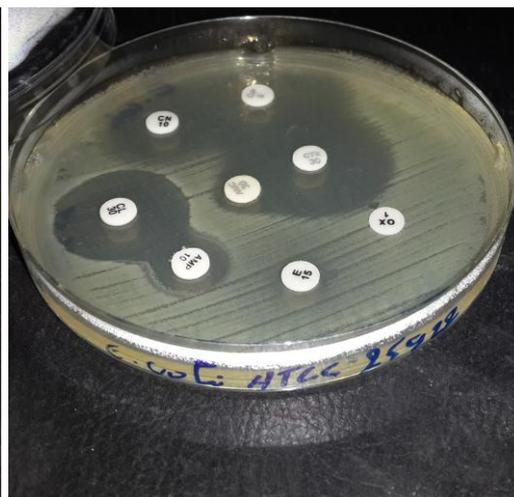


Figure 02. Antibiogramme d'*E. coli* 25923



Figure 03. Antibiogramme d'*E. coli* E52

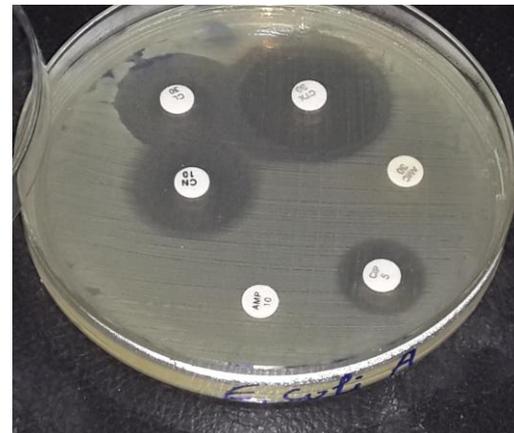


Figure 04. Antibiogramme d'*E. coli*

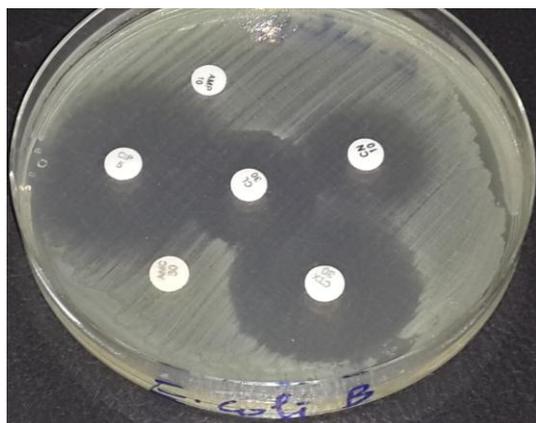


Figure 05. Antibiogramme d'*E. coli* B

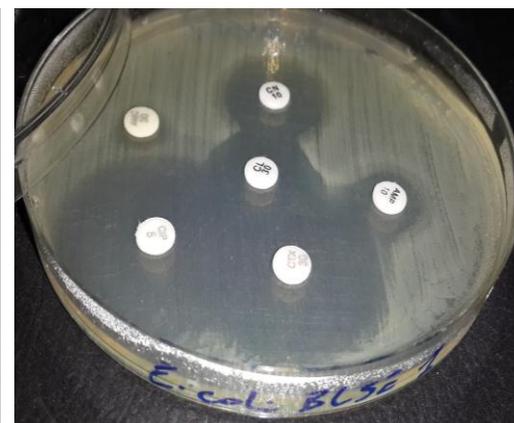


Figure 06. Antibiogramme d'*E. coli* BLSE1

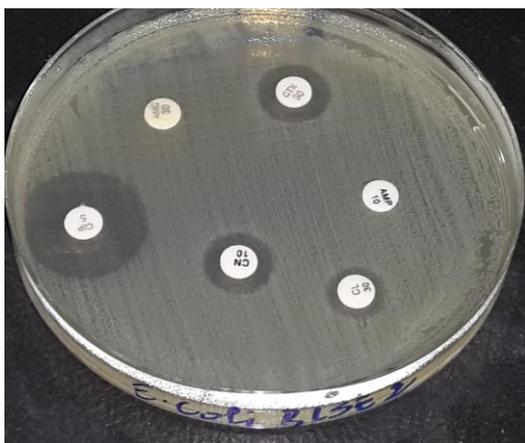


Figure 07. Antibiogramme d'*E. coli* BLSE 2

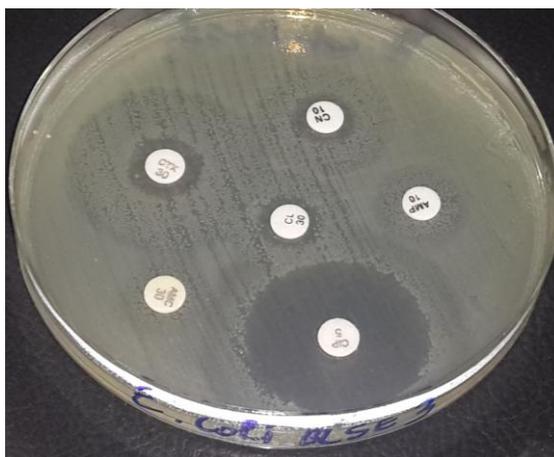


Figure 08. Antibiogramme d'*E. coli* BLSE 3



Figure 09. Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae* BLSE 3



Figure 10. Antibiogramme de *Klebsiella pneumoniae* BLSE 1

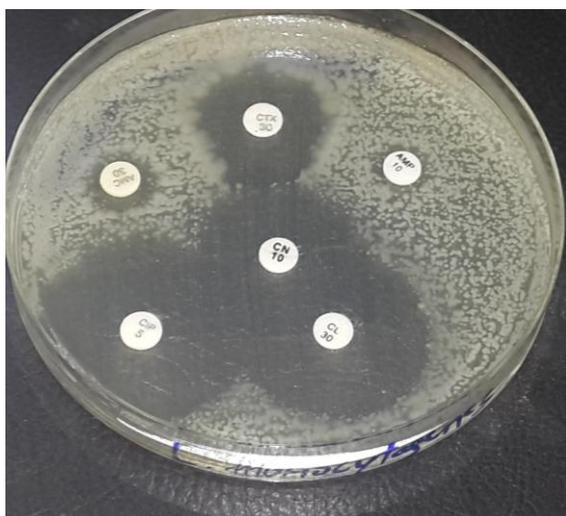


Figure 11. Antibiogramme de *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932)

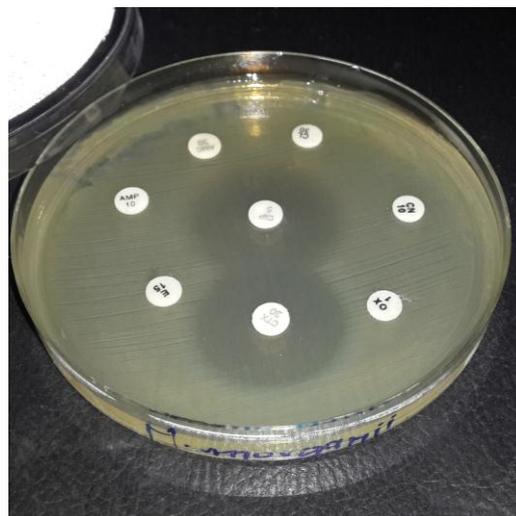


Figure 12. Antibiogramme de *Morganella morganii*

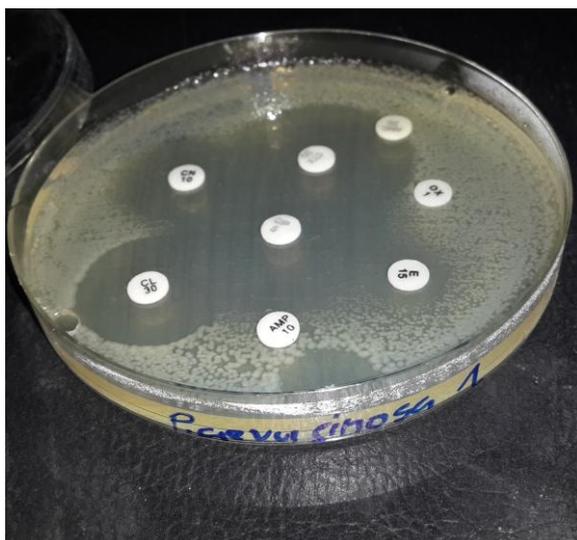


Figure 13. Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* 1



Figure 14. Antibiogramme de *Pseudomonas aeruginosa* 2



Figure 15. Antibiogramme de *Proteus mirabilis*

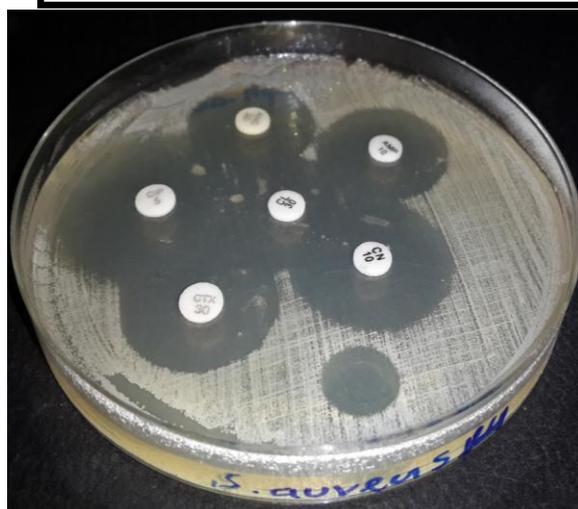


Figure 16. Antibiogramme de *Staphylococcus aureus* (H)



Figure 17. Antibiogramme de *Salmonella* sp.



Figure 18. *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)

Annexe 02. Figures de test de l'activité antibactérienne négatif sur milieu solide de la souche A12

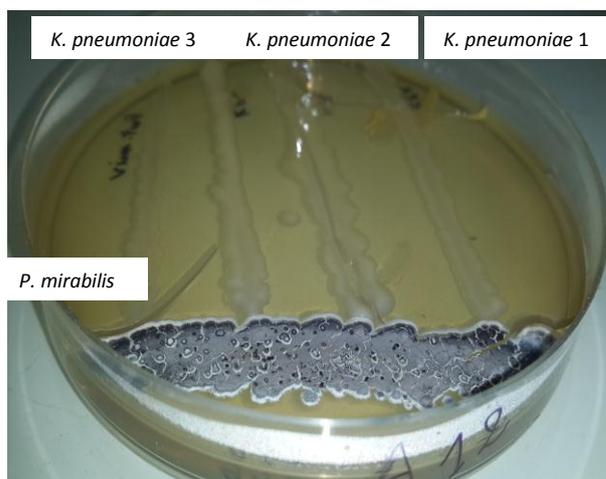


Figure 01. Activité antibactérienne contre les souches sus indiqués

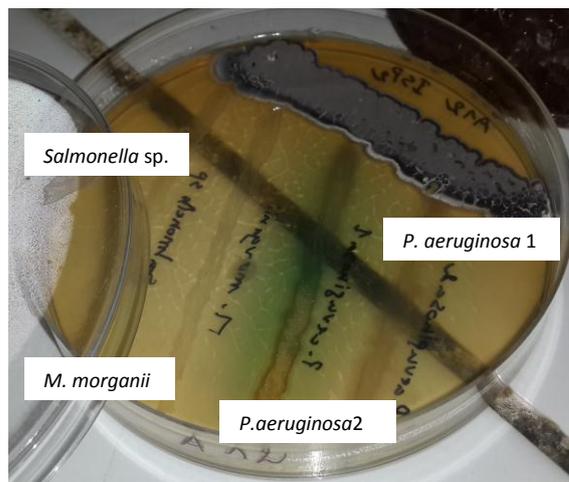


Figure 02. Activité antibactérienne contre les souches sus indiqués

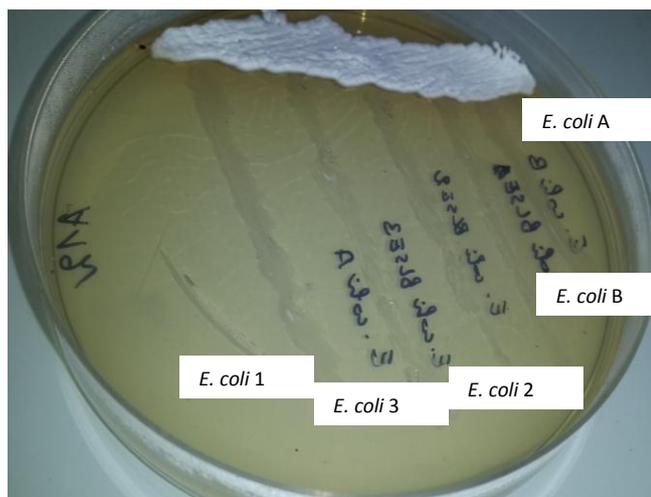


Figure 03. Activité antibactérienne contre les souches sus indiqués

Annexe 02. Figures de test de l'activité antibactérienne négatif sur milieu solide de la souche G46

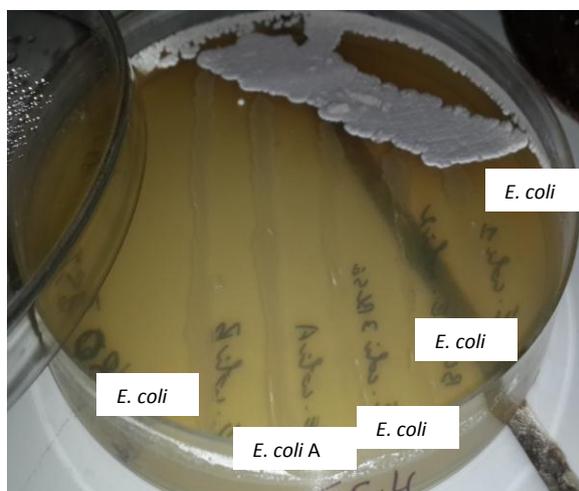


Figure 04. Activité antibactérienne contre les souches sus indiqués

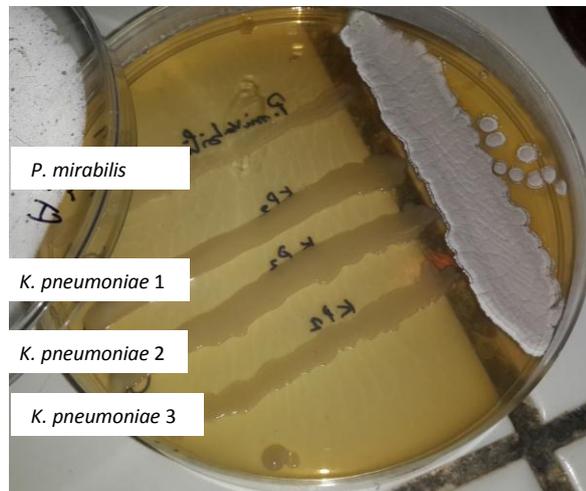


Figure 05. Activité antibactérienne contre les souches sus indiqués

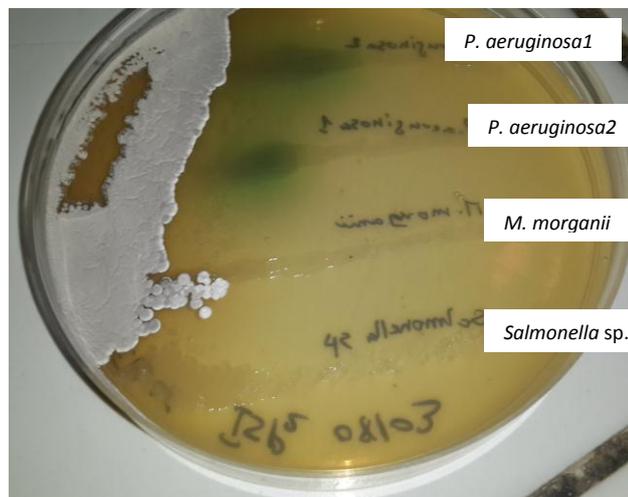


Figure 06. Activité antibactérienne contre les souches sus indiqués

Annexe 03. Propriétés physiques des solvants organiques utilisés :

- Propriétés physiques des solvants organiques utilisés

Propriétés physiques Solvants	Ebullition (°C)	Densité	Polarité
n-Hexane	69	0,659	0,1
Dichlorométhane	40	1,325	3,1
Acétate d'éthyle	77	0,901	4,4
n-Butanol	118	0,810	--