



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE



وزارة التعليم العالي و البحث العلمي
MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

Université des Frères Mentouri Constantine
Faculté des Sciences de la Nature et de la
Vie

جامعة الاخوة منتوري قسنطينة
كلية علوم الطبيعة و الحياة

Département : Microbiologie générale

قسم : الميكروبيولوجيا العامة

Mémoire

Présenté en vue de l'obtention du Diplôme de Master

Domaine : Sciences de la Nature et de la Vie

Filière : Sciences Biologiques

Spécialité : microbiologie générale et biologie moléculaire des microorganismes

Intitulé :

Étude de l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales d'origine saharienne

Présenté par :

Mesbah Amina

Mansouri Ahlam

Soutenu Le : 02 /07/2015

Jury d'évaluation :

Présidente : Mme Kitouni-Oulmi L.

Maitre de conférences classe B

UFM Constantine

Rapporteur : Mme Diabi-Rghioua S.

Maitre assistante classe A

UFM Constantine

Examineur : Mme Mergoud L.

Maitre assistante classe A

UFM Constantine

Année universitaire
2014 - 2015

Remerciements

Liste des abréviations

Liste des figures

Liste des Tableaux

Introduction

1

Revue Bibliographique

1. Les actinomycètes	2
1.1. Généralités	3
1.2. Classification des actinomycètes	3
1.3. Caractères culturels des actinomycètes	4
1.4. Caractères morphologiques des actinomycètes	4
1.4.1 <i>Streptomyces</i>	5
1.4.2 <i>Arthrobacter</i>	5
1.5. Distribution et fonction écologique des actinomycètes	5
1.6. Production des molécules bioactives	6
1.7. Facteurs influençant la production d'agents antimicrobiens	6
1.7.1. Effet des sources nutritionnelles	7
1.7.2. Effet des conditions de culture	8
2. Les antibiotiques	9
2.1. Définition	9
2.2. Classification des antibiotiques	9
2.3. Mode d'action des antibiotiques	9
2.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane	10
2.3.2. Inhibiteurs de la synthèse protéique	10
2.3.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques	11
2.3.4. Antibiotiques qui provoquent l'altération des membranes	12
2.4. Résistance aux antibiotiques	12
2.4.1. Définition	12
2.4.2. La résistance naturelle	12
2.4.3. La résistance acquise	12
2.5. L'évolution de la résistance bactérienne au cours du temps	13
2.6. Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux antibiotiques	14

2.6.1. Inhibition enzymatique	14
2.6.2. Diminution de la perméabilité	14
2.6.3. Altération (ou modification) des sites de liaison	14
2.6.4. Pompes à efflux	14

Matériel et méthodes

1. Bactéries-tests	15
1.1. Isolement et identification	15
1.2. Antibiogramme	15
2. les souches productrices d'antibactériens	15
2.1. Revivification	16
2.2. Purification	16
2.3. Test d'activité antibactérienne	16
2.3.1. Préparations des inocula bactériens	16
2.3.2. Technique des cylindres d'agar	16
3. La conservation des souches	16
4. Analyse statistique	17

Résultats et discussion

1. Purification des souches actinomycétales	18
2. Sensibilité des bactéries-tests aux antibiotiques	20
3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne	20
	25

Conclusion et perspectives

27

Références Bibliographiques

Annexes

Résumés

Ac : Acide

AMX : Amoxicilline

ATCC : American Type Culture Collection

BLSE : β -lactamases à Spectre Etendue

CA-SFM : Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie

CIP : Ciprofloxacine

CMI : Concentration Minimale Inhibitrice

COL : Colistine

CTX : Cefotaxime

CZL : Céfazoline

E : Erythromycine

F : Fosfomycine

FA : Acide Fucidique

FO : Fosfomycine

GEN : Gentamicine

IMP : Imipénème

K : Kanamycine

L : Lincomycine

NA : Acide Nalidixique

OMS : Organisation mondiale de Santé

P : Penicilline

PRL : Piperacilline

RA : Rifamycine

TE : Tétracycline

TOB : Tobramycine

VA : Vancomycine

λ : Longueur d'onde de la radiation

Figure 1 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides.....	04
Figure 2 : Cycle de développement de <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.....	05
Figure 3 : Origines des antibiotiques.....	06
Figure 4: Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques.....	12
Figure 5 : Evolution des résistances au cours du temps.....	13
Figure 6 : Photographie présentant les cultures des souches actinomycétales.....	18
Figure 7 : Aspect microscopique des souches actinomycétales après coloration de Gram....	18
Figure 8 : Photographie montrant la plus grande zone d'inhibition contre <i>Staphylococcus saprophyticus</i> par la souche S3 cultivée sur GBA.....	21
Figure 9 : Photographie montrant la plus grande zone d'inhibition contre <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC par la souche S2 cultivée sur GELM.....	21
Figure 10: Moyennes des pourcentages des activités détectés en fonction du milieu culture.	21
Figure 11 : L'activité antibactérienne de la souche S1 en fonction du milieu de culture.....	23
Figure 12 : L'activité antibactérienne de la souche S2 en fonction du milieu de culture.....	23
Figure 13 : L'activité antibactérienne de la souche S3 en fonction du milieu de culture.....	23
Figure 14 : L'activité antibactérienne de la souche S4 en fonction du milieu de culture.....	23

Tableau 1 : La classification hiérarchique de la classe <i>Actinobacteria</i> basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr / ARNr 16S.....	04
Tableau 2 : Répartition de quelques genres d'actinomycètes par type d'habitat.....	05
Tableau 3 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes.....	06
Tableau 4 : Principales familles d'antibiotiques, spectre et leur mode d'action.....	09
Tableau 5 : Activités antibactériennes des quatre souches actinomycétales étudiées.....	05
Tableau 6 : Interprétation des différents résultats de l'antibiogramme selon les indications du CASFM.....	23

Introduction

La découverte des premiers agents antibactériens, sulfamides en 1935, puis pénicilline au lendemain de la seconde guerre mondiale, avait suscité le grand espoir de voir les maladies infectieuses à jamais jugulées, révolutionné la médecine moderne et a fortement diminué la souffrance humaine. L'usage massif des antibiotiques a abouti, non à l'élimination des infections mais à apprendre aux microbes à résister à ces antibiotiques en exerçant une pression de sélection qui a favorisée l'émergence de gènes de résistance chez les bactéries aboutissant à des souches multirésistantes responsables d'infections graves. Ces dernières années la résistance bactérienne aux antibiotiques est devenue un phénomène mondial inquiétant (**Courvalin et Philippon, 1990 ; Hugues Fleury, 2008 ; Bevilacqua, 2011**), car le nombre d'antibiotiques efficaces se restreint de plus en plus. L'OMS a déclaré par le biais de son sous directeur générale pour la sécurité sanitaire (Dr Keiji Fukuda) lors de la journée mondiale de la santé organisé le 07 avril 2014 que : "*... le monde s'achemine vers une ère post-antibiotiques, où des infections courantes et des blessures mineures qui ont été soignées depuis des décennies pourraient à nouveau tuer...*".

Devant cet énorme problème de santé publique, l'utilisation appropriée des antibiotiques restent absolument nécessaire pour prolonger la durée de validité clinique de ces molécules. Cependant, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou chercher de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par : l'extraction de nouveaux dérivés chez des mutants de souches répertoriées, la réalisation de nouvelles molécules semi-synthétiques à partir de structure connues, la synthèse de nouveaux dérivés ou l'obtention de nouvelles substances produites par de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques à partir d'écosystèmes peu ou pas explorés (**Kitouni 2007**).

Les actinomycètes sont les candidats les plus potentiels pour la production des antibiotiques d'origine bactérienne, notamment les *Streptomyces* qui sont à l'origine de la production de 70% des antibiotiques commercialisés et durant ces dernières années, plusieurs auteurs affirment qu'il faut s'orienter même vers l'exploitation des actinomycètes rares afin de s'alimenter en substances nouvelles (**Berdy, 2005**)

Dans ce cadre, s'inscrit notre travail, qui consiste à étudier l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales d'origine saharienne contre des isolats cliniques en utilisant différents milieux de culture.

Revue bibliographique

1. Les actinomycètes

1.1. Généralités

Les actinomycètes, souvent décrit comme un groupe distinct par les microbiologistes, ce sont en fait des eubactéries, à coloration de Gram positive, à structure végétative de type mycélienne, septée, ramifiée et de haut coefficient de Chargaff (% CG), généralement compris entre 60 et 75 % (**Stackebrandt, 1997 ; Roger et Garcia, 2001 ; Ventura, 2007 ; Zhi, 2009**).

Elles sont principalement, aérobies mais certains genres peuvent être des anaérobies facultatifs, voire même des anaérobies strictes (*Actinomyces*), hétérotrophes, saprophytes et généralement immobiles, ce groupe de bactéries inclut aussi des agents pathogènes pour l'homme, les animaux et les plantes comme *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose humaine), *Mycobacterium bovis* (tuberculose bovine), *Corynebacterium diphtherie* (diphthérie) et *Streptomyces scabies* qui provoque la maladie de la gale chez la pomme de terre et la betterave (**Tortora et al., 2003**).

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec des champignons, du fait de leur morphologie fongoïde (présence de filament ramifiés, sporulation), ainsi que de l'allure mycosique des maladies que certains provoquent (**Gazenko et al., 1998 ; Reponen et al., 1998**).

Toutefois, leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les rangent, sans ambiguïté, parmi les procaryotes (**Becker et al., 1965 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981**).

Ainsi, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité aux actinophages et aux antibactériens, qui confirment le bien-fondé de la classification des actinomycètes parmi les bactéries (**Larpen, 1989 ; Mariat et Sebald, 1990**). Leur analyse génomique a par la suite confirmé cette classification (**Stackebrandt, 1997**).

Les actinomycètes sont généralement mésophiles (température optimale de croissance est entre 25 à 30 °C), d'autres sont thermophiles qui peuvent croître à des température de 55°C à 65°C (**Rangaswami et al., 2004**).

Concernant le pH, la plupart des actinomycètes sont neutrophiles mais ils existe également d'autre qui sont acidophiles comme le genre *Streptacidiphilus* (Wang *et al.*, 2006).

Chez la plupart des actinomycètes, la germination des spores peut être observer à des valeurs d'activité d'eau supérieurs ou égale à 0.67 et l'activité d'eau optimale pour la croissance et le développement des actinomycètes est égale à 0.98 (Zvyagintsev *et al.*, 2005).

Parmi les actinomycètes, il y a également des espèces halophiles et halotolérantes, l'étude menée par Djaballah (2010) a montré l'existence de ce type de microorganismes dans les milieux extrêmes tels que la sebkha, avec des isolats qui poussent en saturation de NaCl.

1.2. Classification des actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaire.

L'identification des genres est facilitée par des études :

- Morphologiques : mycélium fragmenté ou non, présence ou non de mycélium aérien, couleur des mycélia, production des spores,.... etc.
- Chimio -taxonomiques : la composition cellulaire en acides aminées, en sucres et en lipides, ...etc.

Alors que celle des espèces est basée sur des critères :

- Physiologiques : tolérance au chlorure de sodium, croissance en différentes valeurs de température et de pH, recherche des enzymes et différents métabolites intermédiaires et terminaux.
- Moléculaires : détermination du (G+C)%, séquençage des gènes de l'ARNr 16S, hybridation ADN-ADN (Smaoui, 2010).

Durant ces dernières années, la classification des actinomycètes a évoluée considérablement.

L'analyse des séquences des gènes codant pour l'ARN ribosomale 16S, proposée par Stackebrandt *et al.*, (1997) a permis plus que n'importe quelle autre méthode, d'établir un groupement phylogénétique des actinomycètes.

Selon la classification du « **Taxonomic Outline of The procaryotes, Bergey's Manual of systematic Bacteriology** » (2012), le phylum *Actinobacteria* (bactéries riches en GC : >50 % par mol) est vaste et très complexe, il comprend une seule classe (*Actinobacteria*), qui est devisé

en 05 sous classes : *Acidimicrobidae*, *Rubobacteridae*, *Coriobacteridae*, *Sphaerobacteridae* et *Actinobacteridae*. Dans cette dernière, l'ordre des *Actinomycetales* est subdivisé en 10 sous-ordres : *Actinomycineae*, *Micrococcineae*, *Corynebacterineae*, *Micromonosporineae*, *Propionibacterineae*, *Pseudonocardineae*, *Streptosporogineae*, *Frankinea*, *Glycomycineae* et *Streptomycineae*, (**Tableau 1**).

Tableau1: La classification hiérarchique de la classe *Actinobacteria* basée sur l'analyse phylogénétique de l'ADNr /ARNr 16S(Garrity, 2004).

Classe <i>Actinobacteria</i>					
S/Cl	<i>Acidimicrobidae</i>	<i>Rubrobacteridae</i>	<i>Coriobacteridae</i>	<i>Sphaerobacteridae</i>	<i>Actinobacteridae</i>
S/Cl	<i>Actinobacteridae</i>				
Ordres	<i>Bifidobacteriales</i>			<i>Actinomycetales</i>	
	<i>Ordre Actinomycetales</i>				
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O
<i>Actinomycineae</i>	<i>Micrococceinae</i>	<i>Corynebacterineae</i>	<i>Micromonosporineae</i>	<i>Propionibacterineae</i>	<i>Actinomycineae</i>
Famille	Familles	Familles	Famille	Familles	Famille
<i>Actinomycetaceae</i>	<i>Micrococcaceae</i> <i>Bogoriellaceae</i> <i>Rarobacteraceae</i> <i>Sanguibacteraceae</i> <i>Brevibacteriaceae</i> <i>Cellulomonadaceae</i> <i>Dermabacteraceae</i> <i>Dermatophilaceae</i> <i>Dermacoccaceae</i> <i>Intrasporangiaceae</i> <i>Jonesiaceae</i> <i>Microbacteriaceae</i> <i>Beutenbergiaceae</i> <i>Promicromonosporaceae</i>	<i>Corynebacteriaceae</i> <i>Dietziaceae</i> <i>Gordoniaceae</i> <i>Mycobacteriaceae</i> <i>Nocardiaceae</i> <i>Tsukamurellaceae</i> <i>Williamsiaceae</i>	<i>Micromonosporiaceae</i>	<i>Propionibacteriaceae</i> <i>Nocardiodaceae</i>	<i>Actinomycetaceae</i>
S/O	S/O	S/O	S/O	S/O	S/O
<i>Psuedonocardineae</i>	<i>Streptomycineae</i>	<i>Streptosporangineae</i>	<i>Frankinea</i>	<i>Glycomycineae</i>	<i>Psuedonocardineae</i>
Familles	Famille	Familles	Familles	Famille	Familles
<i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>	<i>Streptomycetaceae</i>	<i>Streptosporangiaceae</i> <i>Nocardiopsaceae</i> <i>Thermomonosporaceae</i>	<i>Frankiaceae</i> <i>Geodermatophilaceae</i> <i>Microsphaeraceae</i> <i>Sporichthyaceae</i> <i>Acidothermaceae</i> <i>Kineosporiaceae</i>	<i>Glycomycetaceae</i>	<i>Pseudonocardiaceae</i> <i>Actinozynnemataceae</i>

S/Cl: sous classe,

S/O: sous ordre

1.3. Caractères culturels des actinomycètes

Avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, les actinomycètes ont une croissance lente par rapport aux autres bactéries (**Kitouni , 2007**). Au laboratoire, les colonies visibles apparaissent au bout de 3 à 4 jours, le mycélium aérien mature, portant les spores, peut prendre 7 à 14 jours pour se développer, d'autres actinomycètes plus lents exigent plus d'un mois d'incubation (**Kulkarni S.W., 2003**).

Lorsqu'ils croissent sur un substrat solide comme le sol ou la gélose, les actinomycètes développent un réseau ramifié d'hyphes poussant à la fois à la surface et à l'intérieur du substrat pour former un tapis dense d'hyphes qu'on l'appelle mycélium végétatif. Chez beaucoup d'actinomycètes, les hyphes végétatifs se différencient en hyphes poussent vers le haut et forment un mycélium aérien qui s'élève au dessus du substrat. C'est à ce moment là, où les composés médicalement utilisés sont synthétisés (**Prescott et al., 2010**).

En culture liquide sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores restent en surface pour croître en contact de l'air. Cependant en milieu liquide avec agitation et/ou par injection d'air ou d'oxygène. Les *Streptomyces* croissent par élongation des filaments et peuvent présenter trois types de morphologies : des hyphes ramifiés forment des enchevêtrements ; ou encore des pelotes dont la taille peut varier de 0.1µm à plusieurs millimètres (**Figure 1**) (**Saffroy, 2006**).

1.4. Caractères morphologiques

Les membres des *Actinobacteria* sont deux types : unicellulaires tels que les genres *Micrococcus* (coques) et *Arthrobacter* (bâtonnets irréguliers) et d'autres genres qui produisent des filaments multicellulaires qui se développent sur et dans le milieu (mycélium végétatif) ou à la surface, au dessus du substrat (mycélium aérien) tels que le genre *Streptomyces* (**Aouar, 2006**).

1.4.1. *Streptomyces*

Le terme *Streptomyces* provient du grec *Strepto* (courbé, tordu) et *Myces* (champignon) (**Prescott et al., 2010**).

La structure complexe des colonies de *Streptomyces* (**Figure 2**) montre le degré de différenciation d'un tel organisme. Sur milieu solide, débute par la germination d'une spore qui

donne naissance à un mycélium végétatif formé d'hyphes multi-nucléoïde, ramifiés et ancrés dans le milieu. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat. En effet, le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien (Miguélez *et al.*, 1999). La croissance des hyphes est apicale (Flårdh, 2003), et s'accompagne de la formation de septa, Les cellules se différencient ensuite pour former des spores. Cela se traduit par l'épaississement des parois cellulaires (qui rend les spores plus résistantes à la dessiccation). En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif, même si certains *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement (Hodgson, 1992).

1.4.2. *Arthrobacter*

Le genre *Arthrobacter* contient des bâtonnets aérobies. Le caractère le plus distinctif de ce genre est un cycle de développement bâtonnet-coque . En phase de croissance exponentielle, les *Arthrobacter* sont des bâtonnets irréguliers ramifiés et peuvent se diviser par un processus qu'on appelle division par cassure. Lorsqu'elles entrent en phase stationnaire, les cellules prennent une forme coccoides (Presscott *et al.*, 2010).

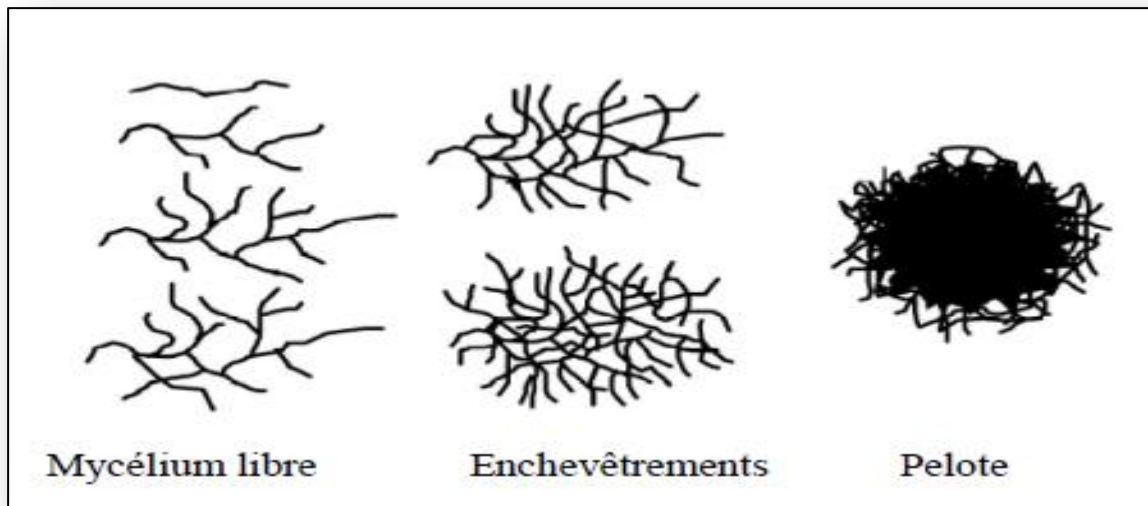


Figure 1 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

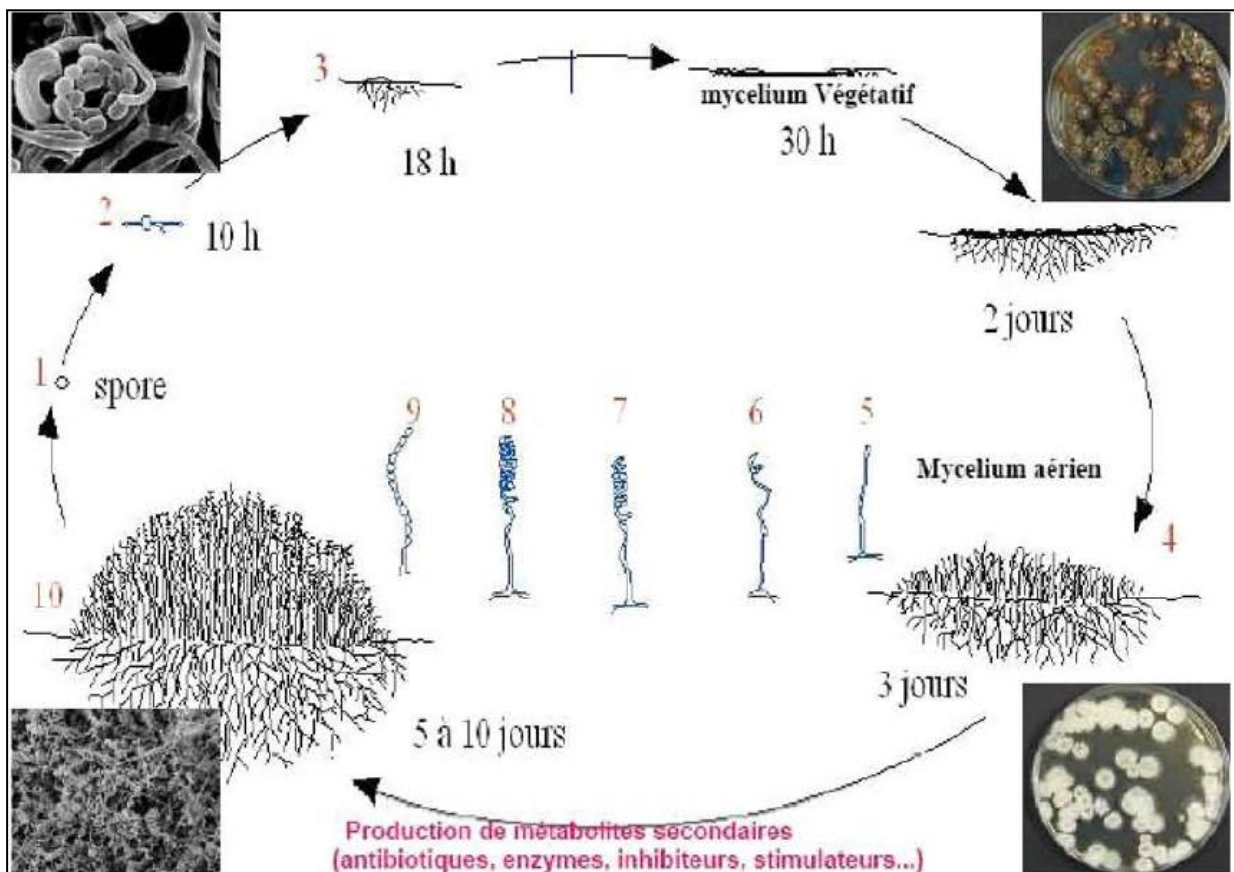


Figure 2 : Cycle de développement de *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

1.5. Distribution et fonction écologique des actinomycètes

Les actinomycètes sont adaptés à divers milieux écologiques (**Goodfellow et Williams 1983**). Ainsi, ils peuvent être dans les sols, dans les eaux douces ou salines et dans l'air. Toutefois, ils sont particulièrement abondants dans le sol, spécialement dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques où ils constituent une part importante de la population microbienne (**Loqman, 2009**) comme le montre le **tableau 2**.

Certains genres d'actinomycètes préfèrent des habitats spécifiques, comme les *Micromonospora* qui sont abondants dans les lacs, les *Actinomyces* et les *Nocardia* qui préfèrent les cavités des hommes et des animaux et les *Thermoactinomyces* qui se retrouvent généralement dans les sources hydrothermales où la température est élevée. Les *Streptomyces* sont très abondants et se retrouvent presque partout, **Enghusen (1956)** explique l'abondance de ce genre par la résistance à la dessiccation de leurs spores (plus de trois ans) (**Waksman, 1961**).

La fonction écologique principale des actinomycètes au sein des écosystèmes est la décomposition des substances organiques (**Prescott et al., 2010**), grâce à leurs capacités de produire une large gamme d'enzymes hydrolytiques, comme les protéases, les nucléases, les lipases (**Prakash et al., 2012**), ainsi que les enzymes d'hydrolyse des sucres complexes comme : la cellulose, hémicellulose et certaines d'entre eux attaquent même la carapace chitineuse des cadavres d'insectes (**Maier et al., 2009**).

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

Genre	Habitat
<i>Actinomadura</i>	Sol
<i>Actinoplanes</i>	Sol, eau, litière
<i>Frankia</i>	Nodules de racines
<i>Microbispora</i>	Sol
<i>Micromonospora</i>	Sol, eau
<i>Nocardia</i>	Sol, eau
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eau, fumier, litière
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière
<i>Streptosporangium</i>	Sol
<i>Thermomonospora</i>	Matière en décomposition et fermentation

1.6. Production des molécules bioactives

Depuis 1940, les actinomycètes, spécialement les *Streptomyces* retiennent l'attention des scientifiques par la production des antibiotiques et de différents métabolites. Le **tableau 3** illustre les différents métabolites produits par les actinomycètes.

Les actinomycètes ont la capacité de produire une large variété de molécules bioactives entre autres des antibiotiques, En fait, 45% des antibiotiques connus, sont naturellement issus des actinomycètes et plus particulièrement du genre *Streptomyces* (**Figure 3**) (**Sibanda et al., 2010**). Parmi les antibiotiques qui ont des applications thérapeutiques on peut citer: les aminoglycosides, les anthracyclines, les glycopeptides, les beta-lactamines, les tetracyclines, les macrolides,...etc.

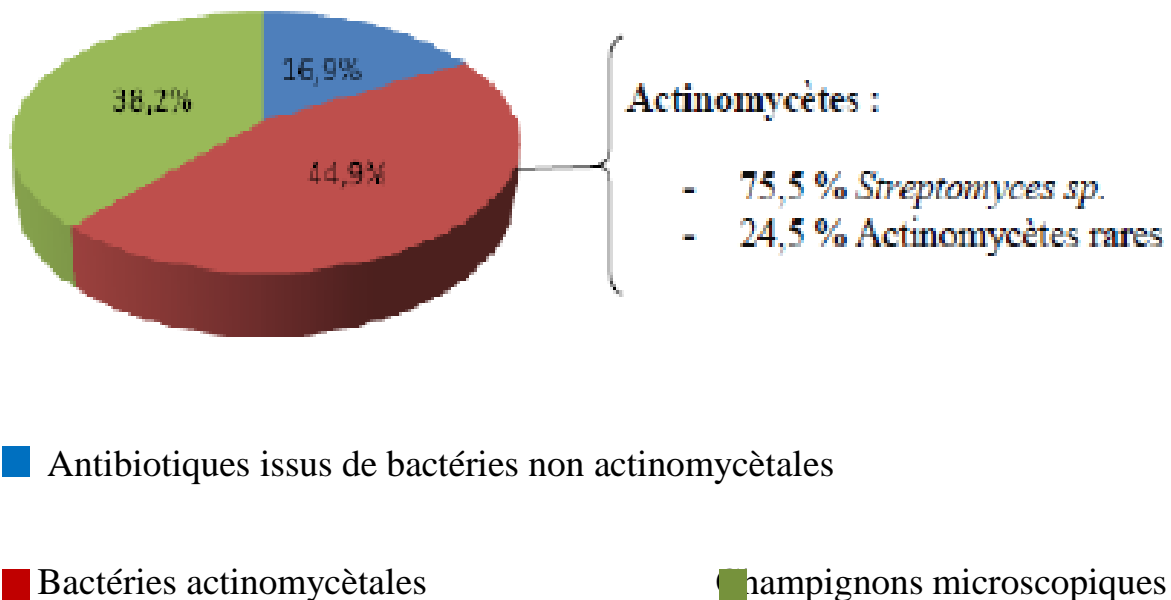


Figure 3 : Origines des antibiotiques (**Berdy, 2005**)

Tableau 3 : Quelques exemples d'antibiotiques produits par les actinomycètes (Loucif, 2011)

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

1.7. Facteurs influençant la production d'agents antimicrobiens

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement influencée et connectée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires à l'issue du métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires (Smaoui, 2010).

Chez l'organisme producteur, la biosynthèse des antibiotiques varie quantitativement et qualitativement suite à une modification des conditions de culture, et donc le rendement des molécules bioactives peut être augmenté par optimisation de nombreux paramètres entre autres nutritionnelles (source de carbone, source d'azote et source de phosphate) et physicochimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligoéléments, température, pH, aération,...etc.) (Higgs, 2001).

1.7.1. Effet des sources nutritionnelles

Les différents composants du milieu de culture ont montré une grande influence sur la production de métabolites secondaires, entre autres chez les actinomycètes.

Parmi les sources nutritionnelles, les sources de carbone, d'azote et de phosphate affectent fortement cette production. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique (Martin et Demain, 1980).

➤ **Effet de la source de carbone**

Plusieurs travaux ont montrés que la production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure sur une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol (Lebrihi *et al.*, 1988 ; Lounès *et al.*, 1995).

➤ **Effet de la source d'azote**

Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure. En effet, La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production.

La source d'azote généralement utilisée est l'ammonium, les acides aminés, ou dans une moindre mesure les nitrates. De même que pour la source de carbone, la biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement

assimilables, en particulier par l'ammonium. En dépit de l'action inhibitrice de ces ions, les sels d'ammonium semblent favoriser, selon leur nature la production de certains antibiotiques, l'exemple de sulfate d'ammonium, décrit comme étant la meilleure source d'azote pour la production de rapamycine. Les nitrates et les acides aminés, grâce à leur lente dégradation permettent une croissance plus lente et une productivité spécifique supérieure à celle obtenue avec les ions ammonium (**Saffroy, 2006 ; Strub, 2008 ; Chorin 2009**).

➤ **Effet de la source de phosphate**

La source de phosphate est aussi d'une grande importance, du fait qu'elle peut conduire à l'arrêt de la production de certains antibiotiques (**Smaoui, 2010**). Les concentrations inhibant la production varient en fonction des différentes espèces et les antibiotiques peuvent être classés en trois groupes selon la concentration tolérée en phosphates : ceux dont la production est inhibée par des concentrations inférieures ou égales à 1mM, ceux tolérant des concentrations comprises entre 1 et 10mM et des antibiotiques dont la production est inhibée par des concentrations supérieures à 10mM (**Saffroy, 2006**).

➤ **Les oligoéléments**

Les oligoéléments, quant à eux jouent un rôle important quantitativement et qualitativement dans la biosynthèse des antibiotiques. Le manganèse, le fer et le zinc sont les ions métalliques les plus importants pour la production des antibiotiques. (**Strub, 2008**).

1.7.2. Effet des conditions de culture

Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectent énormément la production des métabolites secondaires (**Smaoui, 2010**), ce qui rend le choix de ces facteurs d'une importance capitale pour l'optimisation de cette biosynthèse.

2. Les antibiotiques

2.1. Définition

Depuis celle donnée par Waksman en 1942, la définition d'un antibiotique a connu plusieurs évolutions. À l'heure actuelle, le terme antibiotique désigne toute substance naturelle ou synthétique, d'origine microbienne ou dérivée chimiquement, capable d'inhiber spécifiquement la vitalité des microorganismes (Walsh, 2003 ; Zomahoun, 2005). On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (Prescott, 2003).

2.2. Classification des antibiotiques

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification

Les antibiotiques peuvent être classés selon :

- le site d'action sur les agents infectieux (paroi, membrane, acide nucléique et protéines).
- les microorganismes qu'ils inhibent (des antibiotiques antimycosiques, antitumoraux, antiviraux et antiprotozoaires).
- la structure chimique.

En utilisant ce dernier moyen de classement, nous pouvons distinguer plusieurs familles, elles-mêmes divisées en plusieurs classes, répertoriés dans le **Tableau 4 (Smaoui, 2010)**.

Tableau 4: Principales familles d'antibiotiques, spectre et leur mode d'action (Robert-Dernuet S., 1995).

Familles	Antibiotiques	Spectre
Produits d'origine biologique		
B-lactamines	Pénicilline G Pénicilline V Oxacilline (Méticilline) Ampicilline Amoxicilline Carbénicilline Ticarcillne Pipéracilline	Etroit (cocci à Gram positif et à Gram négatif, bacilles à Gram positif) Etroit (cocci à Gram positif) Large
Aminosides	Streptomycine Néomycine Kanamycine Nétilmycine Tobramycine Gentamicine Amikacine	Large
Tétracyclines	Tétracycline Chlortétracycline Oxytétracycline Doxycycline Minocycline	Large
Phénicolés	Thiamphénicol Chloramphénicol	Large
PRODUITS D SYNTHESE		
Sulfamides	Sulfadiazine Sulfamoxole Sulfisoxazole Sulfaméthoxazole	Large
Diaminopyrimidines	Triméthoprime	Large
Quinolones	Acide nalidixique Acide oxolinique Enoxacine Norfloxacine Ciprofloxacine Ofloxacine	Etroit (bacilles à Gram négatif) Large

2.3. Mode d'action des antibiotiques

En thérapie, les antibiotiques doivent tuer ou inhiber les micro-organismes sans détruire nos cellules. En effet, pour pouvoir être utilisable en pratique clinique, un antibiotique doit se caractériser par une action spécifique sur les germes visés sans perturber le fonctionnement des cellules de l'hôte (Smaoui, 2010).

On distingue des antibiotiques :

2.3.1. Inhibiteurs de la synthèse du peptidoglycane

- **Les bêta-lactamines**

Les bêta-lactamines se fixent sur des protéines de la membrane cytoplasmique appelées les PLP (protéines liant la pénicilline). Ils bloquent leur fonctionnement inhibant ainsi la formation du peptidoglycane. Cette inhibition entraîne le blocage de la multiplication cellulaire. Le peptidoglycane est dégradé sous l'action d'autolysines, ce qui entraîne finalement la lyse bactérienne (Calamita et Doyle, 2002 ; Prescott *et al.*, 2010).

- **La fosfomycine**

C'est un antibiotique bactéricide produit par différentes espèces de bactéries du genre *Streptomyces* mais aussi par *Pseudomonas syringae*. Cette molécule agit par inhibition de la synthèse de la paroi bactérienne (Hendlin et Osborne, 1969).

- **Les glycopeptides**

Les glycopeptides sont la classe d'antibiotiques comprenant la vancomycine. Contrairement aux classes présentées jusqu'ici, les glycopeptides ne sont actifs que sur les bactéries à gram positif. Comme les β -lactamines leur voie est la synthèse de la paroi cellulaire (Reynolds, 1989)

2.3.2. Inhibiteurs de la synthèse protéique

Ces antibiotiques agissent préférentiellement sur la sous-unité 30S et/ou la sous-unité 50S des ribosomes et cela au niveau de l'une des trois étapes principales de la traduction (Euzéby, 2007).

- **Les aminosides ou aminoglycosides**

Ce sont des antibiotiques bactériostatiques à faible doses et bactéricides à forte doses la cible principale de ces molécules est le ribosome, et en particulier sa sous-unité 30S. La plupart des aminoacides se fixent aussi sur la sous-unité 50S. Cette fixation sur le ribosome conduit à

une altération de la synthèse des protéines. Ces molécules induisent également des erreurs de lecture de l'ARN messager provoquant ainsi la synthèse de protéines anormales (**Mimoz, 2003 ; Zomahoun, 2005**).

- **Les tétracyclines**

Ce sont des molécules bactériostatiques ou bactéricides, qui se fixent sur la sous unité 30S du ribosome et inhibent la fixation de l'aminocyl-ARNt sur son site ribosomal (**Zomahoun, 2005 ; Euzéby, 2007**).

- **Les macrolides, les lincosamides et les streptogramines**

Ces antibiotiques sont bactériostatiques ou bactéricides selon leur concentration. Ils se fixent sur la sous unité 50S du ribosome et bloquent les réactions de transpeptidation (streptogramines inhibant la fixation des aminocyl-ARNt) et/ou de translocation (macrolides qui se fixent au niveau du site Aminocyl) (**Philippon, 2006**).

- **L'acide fusidique**

Cet antibiotique a un effet bactériostatique. Il inhibe la synthèse des protéines en agissant sur le facteur d'élongation de la traduction (**Philippon, 2006**).

2.3.3. Inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques

Les antibiotiques de cette catégorie agissent à différents niveaux du métabolisme des acides nucléiques.

- **Les quinolones et fluoroquinolones**

Ces molécules ont une action bactéricide. Après leur pénétration dans la membrane externe des bactéries, elles inhibent la réplication de l'ADN. En effet, les quinolones agissent sur les topoisomérases (ADN gyrases). Il s'en suit alors la formation d'un complexe ADN gyrase-quinolone. C'est ainsi que ces antibiotiques empêchent la réplication, La transcription, la recombinaison et la réparation au niveau du noyau cellulaire inhibant donc la synthèse de l'ADN (**Mimoz, 2003 ; Zomahoun, 2005 ; Euzéby, 2007**).

- **Les rifamycines**

Ce sont des antibiotiques bactéricides. Ils se fixent sur l'ARN polymérase en formant un complexe irréversible ce qui bloque la formation de l'ARN messager (**Zomahoun, 2005 ; Euzéby, 2007**).

- **La mupirocine**

Cet antibiotique inhibe l'isoleucyl-ARN-synthétase qui permet la synthèse de l'ARN de transfert (**Podie-Magne, 1999**).

2.3.4 Les antibiotiques qui provoquent l'altération des membranes

- **Les polymyxines**

Elles appartiennent à la classe des polypeptides cycliques. Grâce à leur caractère amphipatique, elles pénètrent dans la cellule bactérienne et s'insèrent parmi les phospholipides des membranes externes et cytoplasmiques, ce qui entraîne la désorganisation de celles-ci et perturbe la perméabilité membranaire (**Zomahoun, 2005**).

- **La gramicidine**

Cet antibiotique réagit, également, avec les phospholipides et détruit la membrane cytoplasmique (**Podie-Magne, 1999**), la **figure 4** illustre les principaux cibles et les modes d'action des antibiotiques.

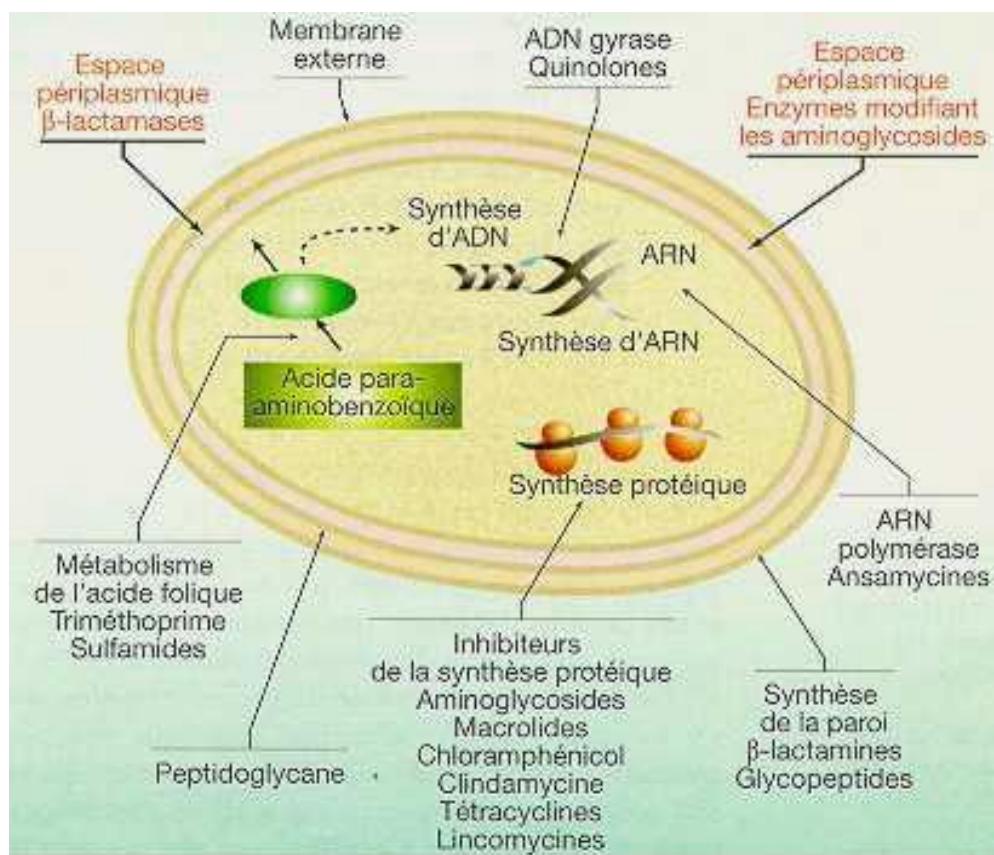


Figure 4 : Principaux cibles et modes d'action des antibiotiques (**Davies et Mazel, 1997**).

2.4. Résistance aux antibiotiques

2.4.1. Définition

Une souche est dite résistante lorsqu'elle peut croître en présence d'une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce (**Zomahoun, 2005**).

Il existe deux grands types de résistance aux antibiotiques, la résistance naturelle et la résistance acquise.

2.4.2. La résistance naturelle

Les bactéries n'étant pas suicidaires, les premières qui ont appris à synthétiser des antibiotiques ont développés dans le même temps, les moyens de s'en protéger. Il s'agit de la résistance naturelle aux antibiotiques (**Lozniewski et Rabaud, 2010**).

La résistance naturelle est un caractère présent chez toutes les souches appartenant à la même espèce (**Smaoui, 2010**). Elle fait partie du patrimoine génétique normal du germe (**Yala et al., 2001**). C'est par exemple le cas des *Escherichia coli* vis-à-vis de la vancomycine, ou encore de *Pseudomonas aeruginosa* face à l'ampicilline. Ainsi *Klebsiella spp* produit naturellement des bêta-lactamases et les bactéries anaérobies sont naturellement résistantes aux aminosides (**Lozniewski et Rabaud, 2010**).

2.4.2. La résistance acquise

À côté de la résistance naturelle, il existe aussi des résistances acquises, c'est l'acquisition de nouveaux gènes capables de rendre la bactérie insensible à un antibiotique ou à un groupe d'antibiotiques. Ces nouveaux gènes peuvent être obtenus soit par mutation au niveau du chromosome, soit par transfert d'ADN des plasmides conjugatifs ou de transposons (**Yala et al., 2001 ; Summers, 2006 ; Wright, 2007**).

2.5. L'évolution de la résistance bactérienne au cours du temps

La résistance des bactéries aux antibiotiques est aujourd'hui un phénomène planétaire et les multirésistances sont préoccupantes, pas uniquement dans les établissements de soins. Elles ont disséminé dans les populations (**Hugues F., 2008**). Durant ces dernières années, on compte un peu moins d'une dizaine d'espèces bactériennes concernées par la résistance aux ATB. Ces bactéries sévissent pour la grande majorité en milieu hospitalier et en milieu institutionnel ; c'est le cas pour *Staphylococcus aureus* méticilline Résistant (SAMR), *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Clostridium difficile*, notamment la souche 027,

Enterococcus résistants aux glycopeptides (EVR) et plus récemment l'émergence de bactéries « super résistantes » entérobactéries BLSE (β -lactamases à Spectre Etendue), principalement impliquées dans des infections nosocomiales . D'autres bactéries sont plutôt communautaires ; c'est le cas du *Streptococcus pneumoniae* résistant à la pénicilline et d'*Escherichia coli* BLSE (Bevilacqua, 2011).

Par ailleurs, on peut compter aussi la résistance de 50% des *Entérocooccus* à la vancomycine . Ces bactéries qui jusqu'en 1990 étaient considérés comme non pathogènes et en particulier *Enterococcus faecium* qui développe chez les patient sous traitement une résistance à plusieurs antibiotiques. Les premières souches d' *Enterococcus faecium* résistant à aux haut niveau aux glycopeptides, vancomycine et teicoplanine, on été rapportées en France et aux Royaume-Uni en 1987-1988, puis aux Etats-Unis en 1989-1990 où elles sont aujourd'hui classées au 3^{ème} rang des bactéries multi-résistantes (Kitouni, 2007) **Figure 6.**

En Algérie, selon le dernier rapport d'évaluation délivré par Réseau Algérien de Surveillance de la Résistance des Bactéries aux Antibiotiques avec le soutien de l'organisation mondiale de la santé, le pourcentage de la résistance à la méticilline chez *Staphylococcus aureus* (SARM) est de 32.67% , 30.25% des entérobactéries BLSE+ et concernant les Entérocoques résistants ERV (Enterocoques résistants à la vancomycine), le réseau a noté 08 souches d' *Entérocooccus faecium* porteurs de gène Van A exprimant une résistance de très haut niveau à la vancomycine et à la teicoplanine. Une étude réalisée au niveau de l'hôpital d'El koléa a montré aussi que la fréquence de la résistance des *S.aureus* à la penicilne G est de (80,6 %) et à la gentamicine (61.53 %) (Boukhatem *et al.*, 2015).

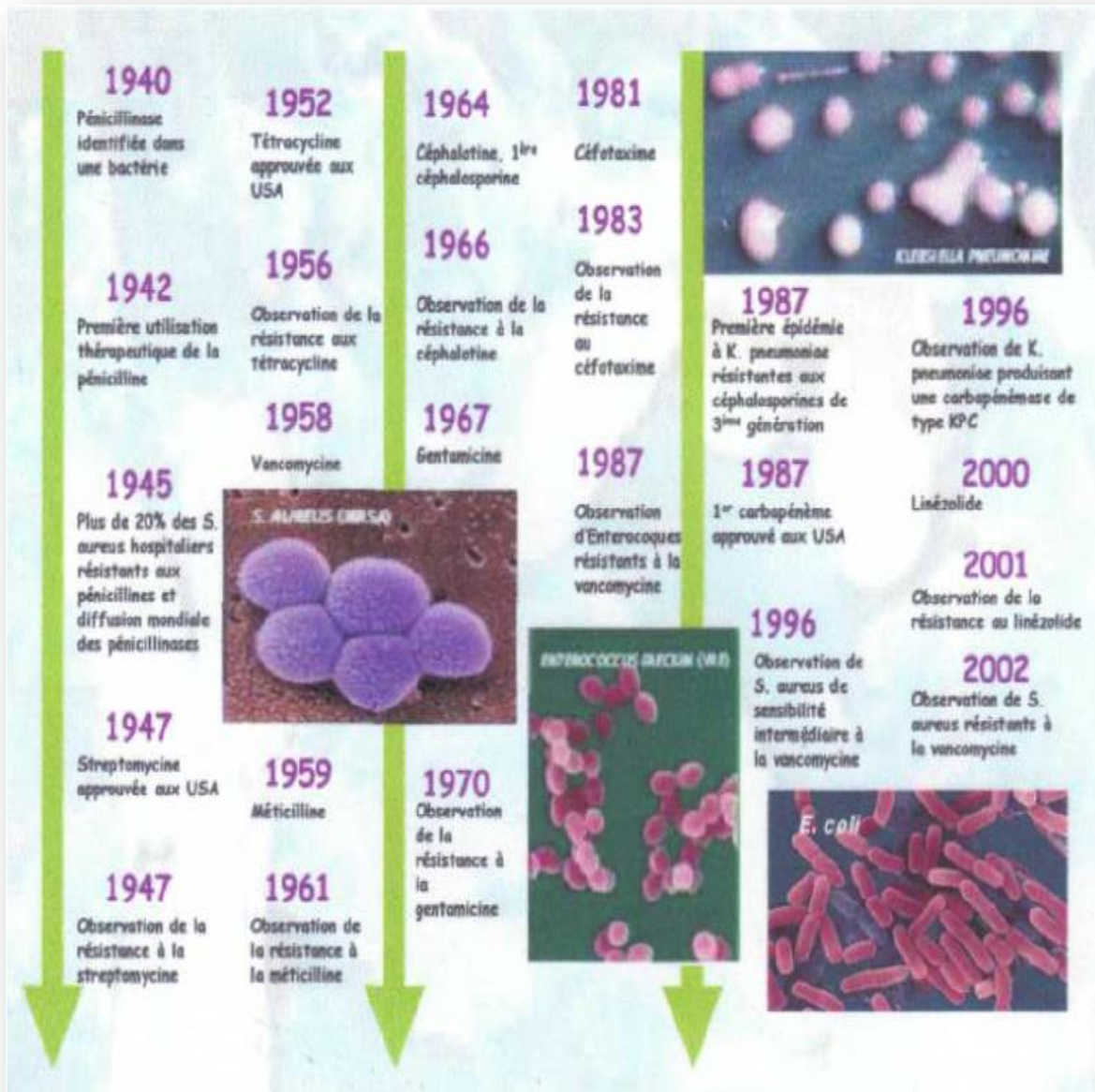


Figure 5 : Evolution des résistances au cours du temps d'après (Bevilaqua, 2011)

2.6. Mécanismes biochimiques de résistance bactérienne aux antibiotiques

2.6.1. Inhibition enzymatique

Le micro-organisme produit une enzyme qui détruit ou inactive l'antibiotique, citons par l'exemple des β -lactamases produites par les entérobactéries pour inactiver les lactamines en détruisant le lien amide sur le cycle lactame.

2.6.2. Diminution de la perméabilité

Par mutation affectant la structure des porines ou diminuant leurs synthèse par les quelles l'antibiotique ne peut pas pénétrer dans la bactérie, citons par exemple le cas de la résistance de *Pseudomonas aeruginosa* à l'imipenem causée par la perte d'une porine spécifique aux carbapenemes(Lozniewski et Rabaud, 2010).

2.6.3. Altération (ou modification) des sites de liaison

Phénomène engendré par des chromosomes ou des plasmides, ce mécanisme de résistance produit une baisse de l'affinité de l'antibiotique pour son site d'action comme le cas d'altération des protéines de liaison aux pénicillines (PLP).

2.6.4. Pompes à efflux (expulsion rapide de l'agent hors de la cellule avant qu'il puisse agir)

Un certain nombre de bactéries possède une capacité intrinsèque de rejeter hors de la cellule la substance qui vient d'y entrer. Cette propriété est très connue chez les bactéries à Gram négatif (c'est le cas de *Pseudomonas aeruginosa*) qui possèdent dans leur membrane des protéines, appelées pompes effluentes, qui expulsent les antibiotiques (Lee, 2006 ; Jayaraman, 2009).

Matériel et Méthodes

1. Bactéries-tests

L'activité antibactérienne a été recherchée contre quatorze bactéries-tests : trois souches provenant de l'ATCC et onze ont été obtenues au niveau du laboratoire de bactériologie (clinique pédiatrique El Mansourah de Constantine).

1.1 . Isolement et identification

Les bactéries-tests ont été isolées à partir de différents prélèvements pathologiques.

L'isolement a été effectué en utilisant différents milieux de culture (gélose au sang, gélose chocolat, gélose hektoen, gélose Chapman et gélose nutritive). Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 37°C pendant 24h. L'identification des isolats a été réalisée ensuite en étudiant les caractères morphologiques (examens macroscopiques et microscopiques) et biochimiques.

1.2. Antibiogramme

Afin de déterminer le profil de sensibilité des bactéries-tests, une suspension bactérienne (préparée dans de l'eau physiologique) de 18-24 h et calibrée à 0,5 Mc Farland (annexe 2), ensuite ensemencée par écouvillonnage sur milieu Muller-Hinton préalablement coulé en boîte de pétri.

L'étape suivante consiste à déposer les disques des antibiotiques à la surface des milieux préalablement ensemencés. Les antibiotiques utilisés sont : fosfomycine (200 µg), lincomycine (2 µg), erythromycine (15 µg), tétracycline (30 µg), chloramphénicol (30 µg), kanamycine (30 µg), gentamycine (10 µg), vancomycine (30 µg), acide fusidique (30 µg), oxaciline (1 µg), cefotaxime (30 µg), piperaciline (100 µg), imipenem (10 µg), péniciline (10 µg), amoxiciline (10 µg), céfasoline (30 µg), nitrofurantoïne (300 µg), colistine (10 µg), Ac. nalidixique (30 µg), ciprofloxacine (5 µg), tobramycine (10 µg), rifamicine (5 µg). Les boîtes sont ensuite gardées à 4°C pendant 30 min puis incubées.

2. les souches productrices d'antibactériens

Quatre souches actinomycétales d'origine saharienne ont fait l'objet de cette étude : trois appartenant au genre *streptomyces* et la quatrième se classe dans le genre *Arthrobacter*.

La caractérisation du genre a été confirmée par l'analyse de l'ADNr 16s dans le cadre d'un travail précédent.

2.1. Revivification

Les quatre souches actinomycétales ont subi une revivification dans du bouillon nutritif. Les tubes sont incubés à 30 °C pendant trois jours.

2.2. Purification

Les différentes souches revivifiées ont subi une purification en utilisant le milieu de Bennett gélosé. Après ensemencement par stries, les boîtes sont incubées à 30°C. La pureté a été vérifiée par coloration de Gram et observation microscopique à l'objectif 100 (microscope Leika DMLS).

2.3. Test d'activité antibactérienne

2.3.1. Préparations des inocula bactériens

Pour chaque bactérie-test, un inoculum est préparé à partir d'une culture de 24 h sur gélose nutritive en déposant quelques colonies dans de l'eau physiologique stérile de manière à obtenir une densité optique qui ne dépasse pas 0,05 à $\lambda = 625$ nm.

2-3-2 Technique des cylindres d'agar (Titora *et al.*, 1979)

Les souches actinomycétales sont ensemencées en stries serrées à la surface de quatre milieux différents (Bennett, GBA, GELM et SCA) (annexe 1) puis incubées à 30°C pendant une semaine à 14 jours. Pour chaque souche étudiée, il faut prélever quatre cylindres d'agar différents (des 4 milieux) de 6 mm de diamètre.

Les cylindres sont ensuite déposés sur le milieu Muller-Hinton préalablement ensemencé par écouvillonnage par les bactéries-tests. Après une pré-diffusion de deux heures à 4°C, Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 24 heures (**Petrosyan *et al.*, 2003 ;Abouwarda et Abu El-Wafa,2011**).

3- La conservation des souches

À partir des cultures bactériennes réalisées sur milieux gélosés, des colonies sont raclées et transférées dans des bouillons nutritifs additionnés de glycérol 20 % (v/v) et conservées à -20°C (**Boughachiche *et al.*, 2012**).

4. Analyse statistique

Pour l'évaluation de l'effet des souches actinomycétales étudiées, des milieux de culture employés et des bactéries-tests sur l'apparition des activités antibactériennes, une analyse de la variance à trois facteurs est réalisée par le logiciel Statistica (version 5.97). Edition Statsoft. France.

Résultats et Discussion

1. Purification des souches actinomycétales

Au cours de la purification, la reconnaissance des souches de *Streptomyces* a été facilitée par leur morphologie caractéristique qui les distingue des autres microorganismes, elles donnent souvent des colonies pigmentées et d'aspect sec. La présence du mycélium aérien rend leur surface poudreuse. Les colonies adhèrent fortement au substrat gélosé. Leur contour est échancré et parfois porte des fructifications. Leur développement non envahissant et leur taille relativement petite les différencient des champignons. Tandis que les membres du genre *Arthrobacter* présentent un aspect qui ressemble plus au moins à celui des bactéries ordinaires présentant des colonies rondes, convexes, lisses, d'une couleur jaune, d'aspect huileux et brillant. Elles sont translucides et ne produisent pas de pigments diffusibles, **figure 6**.

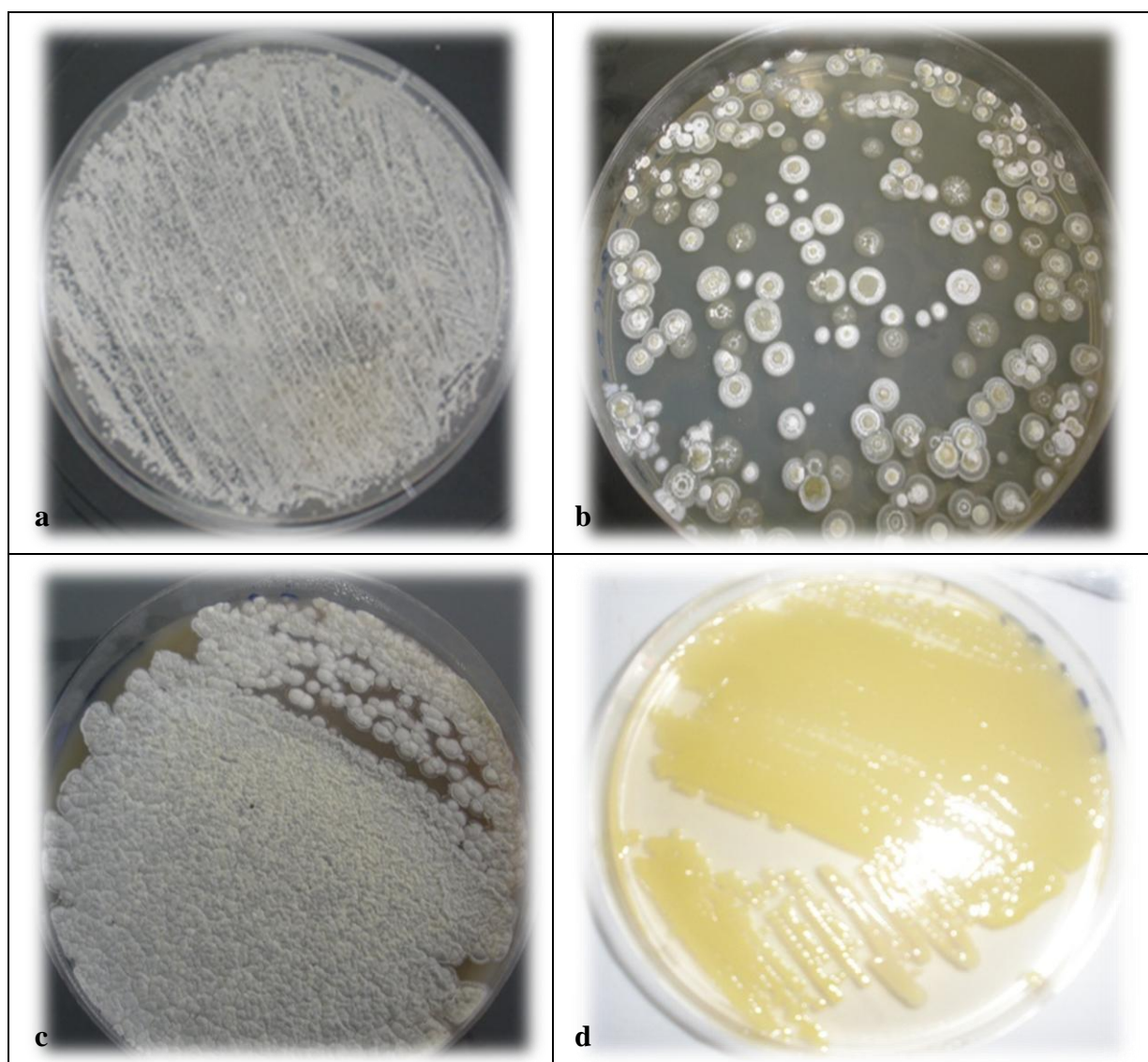


Figure 6 : photographie présentant les cultures des souches actinomycétales.
a : S1, b : S2, c : S3, d : S4 (après 7 jours d'incubation sur le milieu de Bennett)

Le milieu Bennett a été choisi pour la purification des actinomycètes. Il est caractérisé par sa richesse en substrats carbonés (le glucose) et azotés (casaminoacides, extrait de levure et extrait de viande), ce qui stimule la croissance des actinomycètes et facilite leur purification, additionnant sa limpidité se qui permet une bonne lecture des résultats.

Après une coloration de Gram, l'observation microscopique des trois souches du genre *Streptomyces* a révélé la présence des filaments de forme droite ou spirale, positifs à la coloration de Gram et très fins par rapport à ceux observés chez la plupart des champignons. Tandis que chez la souche *Arthrobacter*, l'examen a révélé la présence des cellules fragmentées (bâtonnets courts) irréguliers et /ou des cocci à coloration de Gram positive (Figure 7).

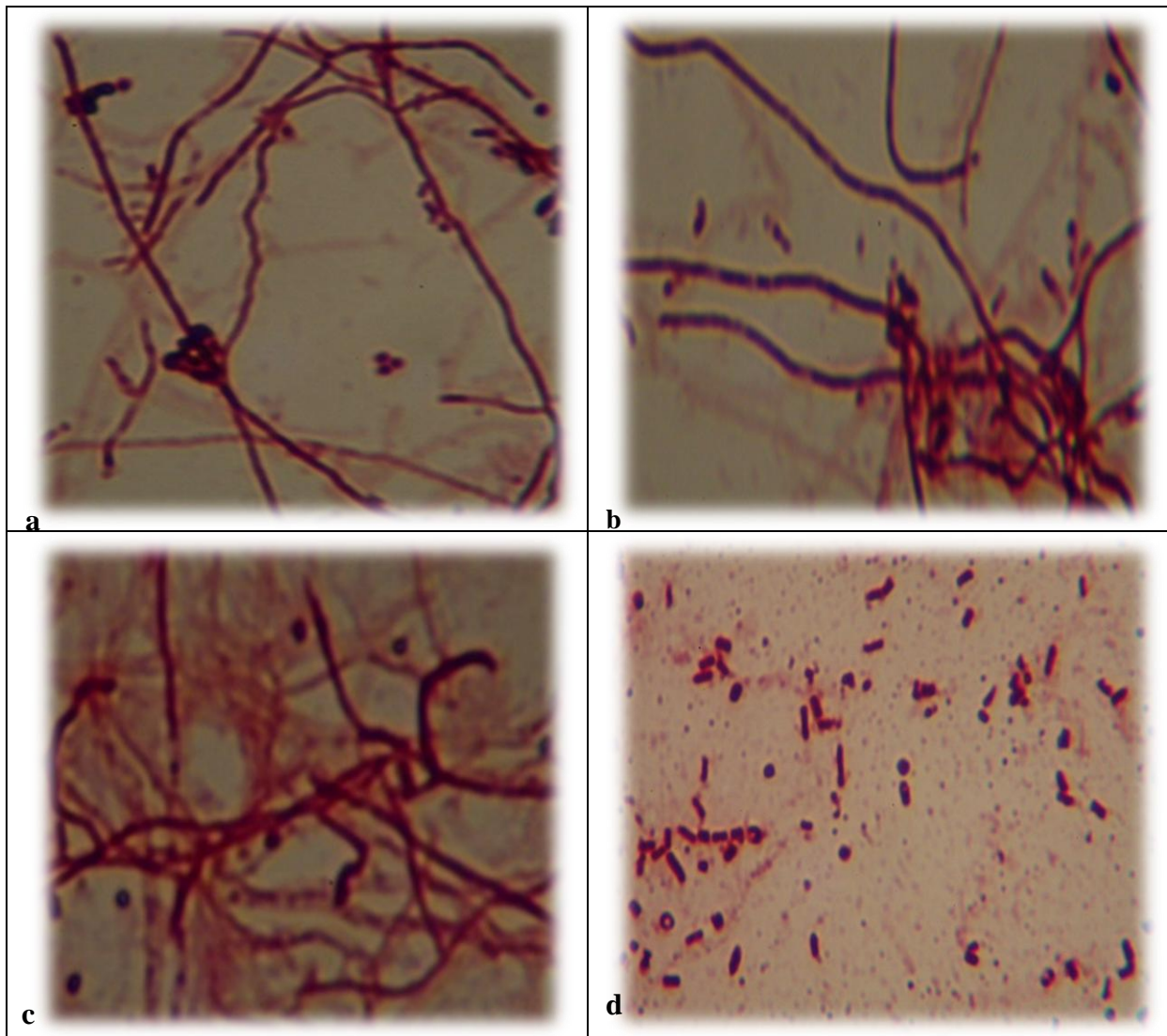


Figure 7 : Aspect microscopique des souches actinomycétales après coloration de Gram (microscopie optique $\times 100$).

a : S1, b : S2, c : S3, d : S4

2. Sensibilité des bactéries-tests aux antibiotiques

La sensibilité des bactéries-tests aux 22 antibiotiques utilisés a donné les résultats présentés dans le **tableau 6**. Les diamètres des zones d'inhibition ont été déterminés et interprétés selon les indications de la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM). L'interprétation des diamètres a permis de classer les bactéries-tests en trois classes : bactérie sensible, bactérie intermédiaire et bactérie résistante.

Tableau 6 : Interprétation des différents résultats de l’antibiogramme selon les indications du CASFM

Familles d'antibiotiques Bactéries test	β-lactamines						Aminoside		Tétracycline	Macrolide	Glyco-peptide	Incosamide	Phénicolés	Sifamycine	Quinolones/RQ			Polypeptide	Acridolique	Rotomycine	
	Pénicillines			Carbapéném			Céphalosporine		TE	E	VA	L	C	RA	NA	CIP	F	COL	FA	FO	
	PI	P	AMX	O	IMP	CTX	CZL	TOB	K	G	E	VA	L	C	RA	NA	CIP	F	COL	FA	FO
<i>S. aureus</i>	/	R	R	/	/	/	/	S	/	S	R	/	/	S	/	S	/	/	/	/	R
<i>S. agalactiae</i>	/	R	S	S	/	/	/	S	/	S	S	/	/	S	/	S	/	/	/	S	R
<i>S. carnosus</i>	/	R	/	/	/	/	/	S	/	/	/	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>E. faecalis</i>	/	R	/	/	S	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>E. coli</i>	S	R	S	/	S	S	I	S	/	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. aeruginosa</i>	S	S	/	/	/	/	/	S	S	/	/	/	/	/	/	/	/	S	/	/	S
<i>Providencia sp.</i>	/	R	/	/	/	S	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. mirabilis</i>	R	/	R	R	S	S	R	/	R	S	R	/	/	/	/	/	/	S	R	/	S
<i>Acinetobacter sp.</i>	R	/	R	/	/	/	/	/	S	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>M. morganii</i>	/	R	R	/	/	/	R	/	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>S. marcescens</i>	S	/	R	S	S	R	R	/	R	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>S. aureus</i> ATCC (25923)	/	S	S	/	/	/	/	S	S	S	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>E. coli</i> ATCC (25922)	/	/	/	/	/	/	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
<i>P. aeruginosa</i> ATCC (27853)	S	/	/	/	/	/	S	S	S	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

S : sensible, I : Intermédiaire, R : Résistante, / : non fait

3. Mise en évidence de l'activité antibactérienne

L'activité antibactérienne de nos souches a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar. Cette technique est une méthode de diffusion en milieu gélosé. Elle nous a permis de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les bactéries-tests utilisées (**Tortora et al., 1979**). La croissance de la bactérie-test ensemencée sur la gélose, permet après incubation, de déceler la présence d'une substance inhibitrice et cela par l'apparition d'une zone translucide au niveau de la zone de diffusion, alors que partout ailleurs, le développement du microorganisme est visible.

Le choix du milieu Muller Hinton a été dicté par sa spécificité et sa richesse permettant une bonne croissance aux bactéries-tests et offrant des résultats claires grâce à sa limpidité.

La faible concentration de l'inoculum reconnue aussi comme un des facteurs intervenant dans l'augmentation de la sensibilité de la technique. Elle a été fixée à une densité optique qui ne dépasse pas 0.05 à une longueur d'onde de 625nm (**Brook et al., 1995**).

Dans le but d'accroître encore la sensibilité de la détection, une pré-diffusion des molécules actives dans la gélose ensemencée, a été favorisée par un séjour de deux heures à 4°C avant l'incubation comme le préconise (**Tortora et al., 1979**).

Plusieurs travaux ont montré que la nature de la source de carbone, d'azote, et de la source minérale des milieux de culture influence énormément la capacité de production des antibiotiques chez les actinomycètes. Pour cette raison, nous avons testés l'activité antibactérienne des 04 souches sur quatre milieux de culture différents, préconisés pour la détection de métabolites antibactériens.

Les résultats obtenus sont rassemblés dans le **tableau 5**, il montre d'une part que 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**).

Tableau 5 : Activités antibactériennes des quatre souches actinomycétales étudiées

Bactéries test	Diamètre d'inhibition (mm)															
	S1				S2				S3				S4			
	SC	GBA	Bensett	GELM	SC	GBA	Bensett	GELM	SC	GBA	Bensett	GELM	SC	GBA	Bensett	GELM
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC (25923)	-	33	-	-	12	-	13	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	24	-	-	-	-	15	-	-	37	-	-	-	-	11	13
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	-	-	-	-	-	13	-	-	-	40	-	-	-	-	12	-
<i>Bacillus cereus</i>	-	22	-	-	-	-	19	-	-	17	-	-	-	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	-	22	20	15	-	12	19	19	-	17	-	-	-	-	-	-
Pourcentage(%) des activités détectées par milieu	0	80	20	20	20	40	80	20	0	80	0	0	0	0	40	20
<i>Escherichia coli</i> ATCC (25922)	-	20	20	-	-	-	-	-	-	15	-	-	-	20	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC (27853)	-	12	-	-	-	-	-	45	-	-	-	-	-	-	-	10
<i>Escherichia coli</i>	-	12	15	-	17	14	13	-	-	18	-	20	-	-	-	-
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-	22	-	-	-	-	14	15	-	-	-	-	-	10	-	-
<i>Providencia sp.</i>	-	15	-	-	-	13	15	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	-	-	20	-	-	-	15	11	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>Acetivibacter sp.</i>	12	-	-	-	-	-	-	-	10	-	-	-	-	-	-	-
<i>Morganella morganii</i>	-	14	-	-	13	17	15	-	-	-	-	-	-	-	-	13
<i>Serratia marcescens</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Pourcentage(%) des activités détectées par milieu	11.11	66.66	33.33	0	22.22	33.33	55.55	33.33	11.11	22.22	0	11.11	0	11.11	0	11.11
Pourcentage (%) total des activités détectées par milieu	7.14	71.42	28.57	7.14	21.42	35.71	64.28	28.57	7.14	42.85	0	7.1	0	14.28	14.28	21.42

Les plus grandes zones d'inhibition ont été obtenues avec les souches S2 (45mm) et S3 (40mm) cultivées respectivement sur les milieux GELM et GBA (Figures 8 et 9).



Figure 8 : photographie montrant la plus grande zone d'inhibition contre *Staphylococcus saprophyticus* par (la souche S3 cultivée sur GBA).

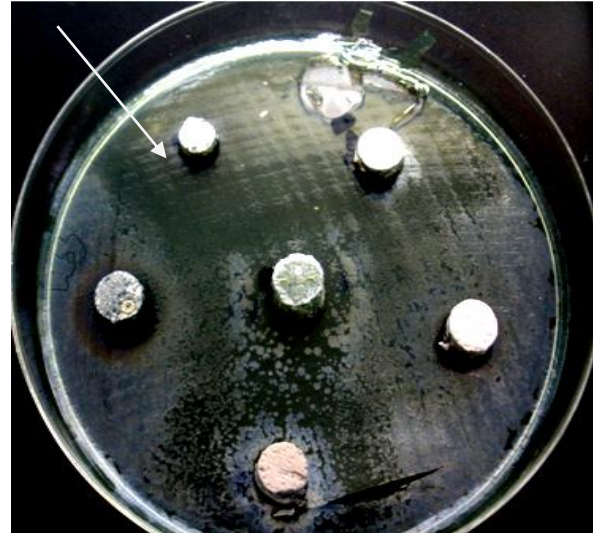


Figure 9 : photographie montrant la plus grande zone d'inhibition contre *Pseudomonas aeruginosa* ATCC par (la souche S2 cultivée sur GELM).

Les résultats de la **figure 10** montrent que la plus grande moyenne des pourcentages des activités détectés est obtenue avec les cylindres d'agar prélevés à partir du milieu de culture GBA (**41.06**) suivie par celle du milieu de Bennett (**26.78**) et du milieu de culture GELM (**21.03**) tandis que la plus faible moyenne est obtenue avec les cylindres d'agar prélevés à partir du milieu SCA (**8.92**). Donc du point de vue qualitatif, le milieu GBA semble être le meilleur milieu pour la mise en évidence de l'activité antibactérienne. Les mêmes observations ont été obtenus par plusieurs auteurs comme (**Shomura et al., 1993 ; Hilali et al., 2002**).

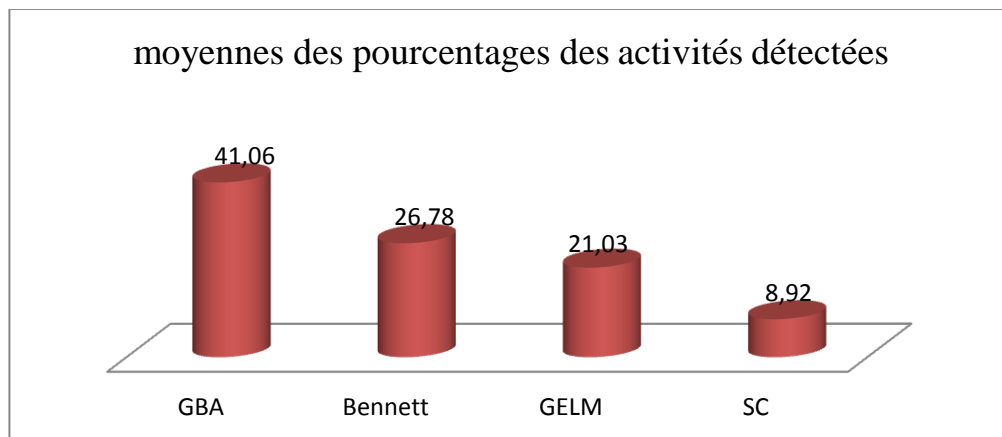


Figure 10 : moyennes des pourcentages des activités détectées en fonction du milieu de culture

La performance du milieu GBA, très utilisé dans la mise en évidence de l'activité antimicrobienne (Shomura *et al.*, 1993 ; Hilali *et al.*, 2002), s'explique par la présence de la amidon, cette source de carbone ,lentement métabolisable, s'avère souvent bonne pour la production d'antibiotique. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par (Aharonowitz ,1978 ; Lebrihi *et al.*, 1988 ; Lounès *et al.*, 1995).

Les sources d'azote de ce milieu sont les peptones et l'extrait de viande qui sont une source difficilement métabolisables. Donc, par conséquence favorisent la production d'antibiotiques (Voelker et Altaba, 2001).

Le carbonate de calcium (CaCO₃) jouant le rôle d'agent tampon, neutralise toute acidification du milieu conduisant à une meilleure production d'antibiotique (Lamari 2006).

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. Nous avons noté que la zone d'inhibition de *Morganella morganii* lorsque les cylindres d'agar sont prélevés à partir du milieu GBA ensemencé par la souche S2 est égale à **17 mm**. Ce diamètre est réduit à **13 mm** contre la même bactérie-test lorsque la souche S2 est cultivée sur le milieu SCA et l'activité disparaît totalement lors de la mise en culture de cette souche sur le milieu GELM.

L'activité antibactérienne contre les bactéries-tests à coloration de Gram(+) apparait plus importante (**100%**) que celle contre les bactéries à coloration de Gram négative (**88,88%**).

Les bactéries-tests à coloration de Gram (+) concernées par l'inhibition sont : *Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*.

Les différences en composition de la paroi entre les bactéries à coloration de Gram positive et négative peuvent être responsables de leurs différences de sensibilité. En effet, les bactéries de coloration de Gram négative portent dans leurs membranes externes des sucres de nature lipopolysaccharidique (LPS) ce qui rend leurs parois imperméables au passage des solutés lipophiles, contrairement aux bactéries à coloration de Gram positif qui ont une paroi tapissée uniquement par le peptidoglycane qui n'est pas une barrière efficace (Sateesh *et al.*, 2011).

En ce qui concerne les performances des souches étudiées, nous notons que la souche S4 (qui fait partie du genre *Arthrobacter*) montre une activité contre certaines bactéries-tests uniquement, dont deux sont à coloration de Gram+ (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*) et deux sont à Gram- (*Escherichia coli* ATCC (25922) et *Morganella morganii*). Les 3 autres souches actinomycétales restantes (qui font partie du genre *Streptomyces*) montrent une activité plus importante que celle de l'*Arthrobacter*. Elles inhibent en totalité (**92,85%**) bactéries-tests (dont 100% à Gram+ et 88.88% à Gram-).

Ces résultats confirment que les *Streptomyces* sont les microorganismes les plus importantes lorsqu'il s'agit de la production d'antibiotiques.

Du point de vue qualitatif la souche S1 semble être la meilleure en ce qui concerne la variété de leurs molécules bioactives (inhibant 85.71 des bactéries-tests) : **80%** sont à Gram+ (*Staphylococcus aureus* ATCC (25923), *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) et **88.88%** bactéries-tests à Gram- (*Escherichia coli* ATCC (25922), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia sp*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, *Acinetobacter sp*). La souche S2 active contre **78.57%** bactéries-tests (dont **100%** sont à Gram+ **66.66%** à Gram-), les bactéries-tests à Gram+ inhibées par celle-ci sont : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus aureus* (ATCC), *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*. Les bactéries-tests à Gram- sont : *Pseudomonas aeruginosa* ATCC (27853), *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Providencia sp*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*). En troisième position la souche S3 a inhibé **50%** bactéries-tests dont **80%** sont à Gram+ : *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*) et **33.33%** à Gram- : *Escherichia coli* ATCC (25922), *Escherichia coli*, *Acinetobacter sp*.

Du point de vue quantitatif, on remarque que la S2 est la meilleure avec le plus grand diamètre d'inhibition obtenu par celle-ci (**Figure 12**), suivie respectivement par la souche S3 (**Figure 13**), S1 (**Figure 11**) et la souche S4 (**Figure 14**).

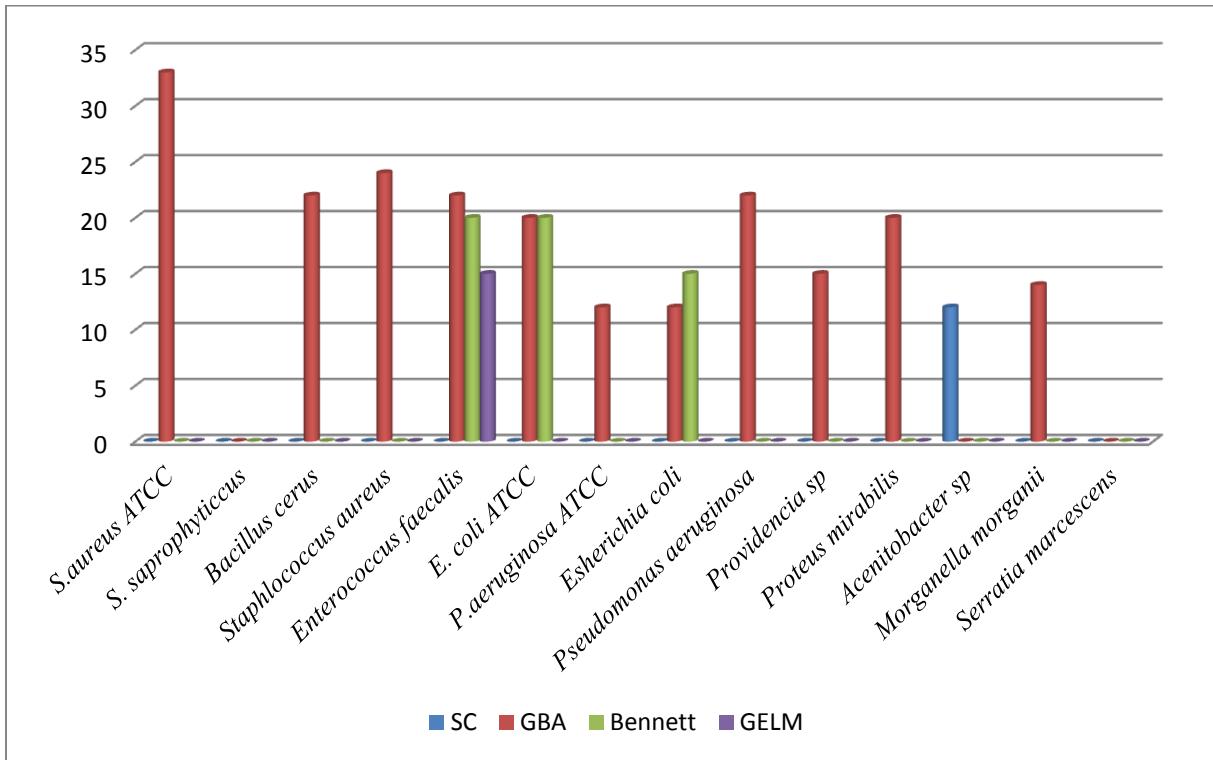


Figure 11 : Activité antibactérienne de la souche S1 en fonction du milieu de culture

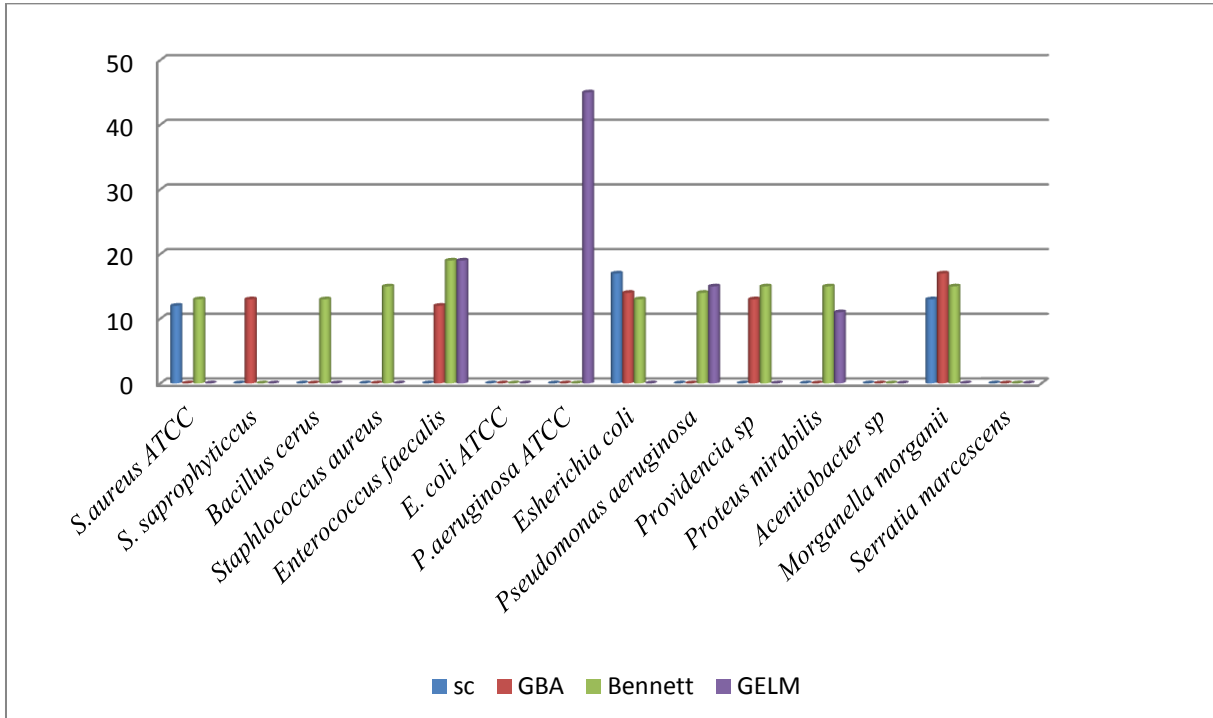


Figure 12 : Activité antibactérienne de la souche S2 en fonction du milieu de culture

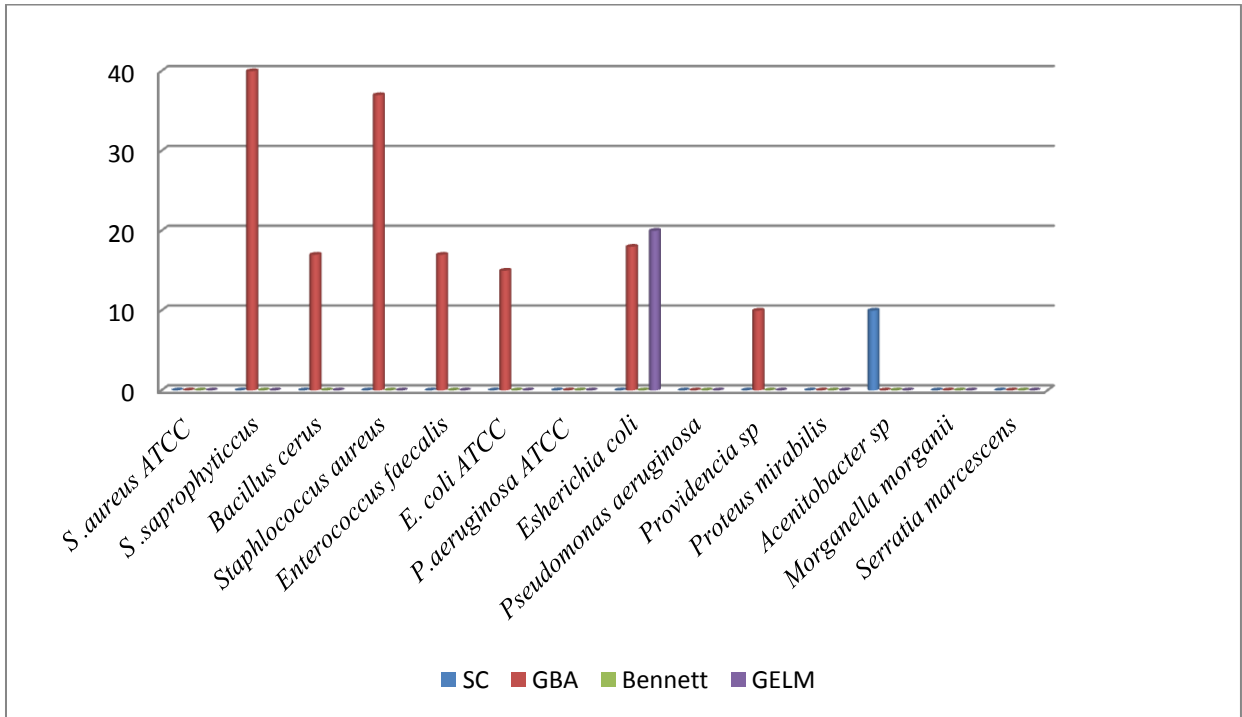


Figure 13 : Activité antibactérienne de la souche S3 en fonction du milieu de culture

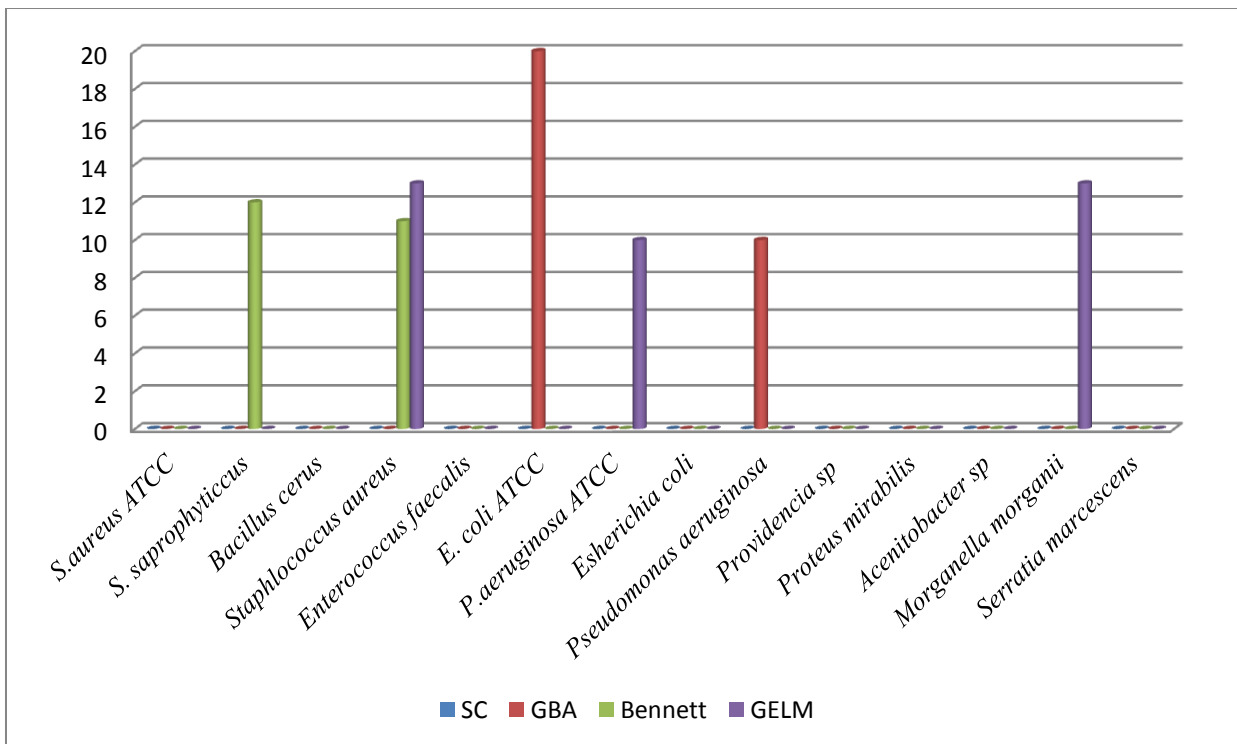


Figure 14 : Activité antibactérienne de la souche S4 en fonction du milieu de culture

Les molécules antibactériennes des 3 *Streptomyces* sont actives contre la majorité des bactéries à Gram+ testées.

La présence d'activité chez les quatre souches actinomycètes étudiées confirme que les actinomycètes isolés à partir des milieux extrêmes ont un pouvoir antimicrobien remarquable par rapport à leurs homologues isolés à partir des autres écosystèmes tels que (rhizosphère, eau douce, sol floristique... etc.) (**Gayathri et al., 2011**).

La mise en évidence de l'activité antibactérienne de nos souches (S1, S2, S3 et S4) a été réalisée contre 14 bactéries-tests dont 11 provenant de la clinique pédiatrique d'El Mansoura-Constantine, la majorité de ces bactéries sont résistantes aux antibiotiques et ont présenté une sensibilité vis-à-vis des substances secrétées par les souches actinomycétales étudiées (en totalité 10 sur 11 de ces bactéries tests sont sensibles. le **tableau 6** montre que parmi les bactéries-tests il y a celles qui sont sensibles aussi à la famille des B-lactamines (PRL, IMP, CTX). Ces derniers ont un large spectre d'activité (**Presscott et al., 2010**) et donc les antibiotiques produits par nos souches peuvent se classer dans la famille des Beta-lactamines.

Il est intéressant de noter que la présence d'activité contre des bactéries résistantes (aux Beta-lactamines, aux tétracyclines, aux macrolides, aux phénicolés et à la fosfomycine) suggère que, les souches actinomycétales étudiées secrètent soit des classes d'antibiotiques différentes (de celles auxquelles les bactéries-tests sont sensibles) soit de nouvelles structures appartenant aux mêmes classes.

L'analyse statistique a révélé l'effet hautement significatif des trois facteurs (souche actinomycétale, milieu de culture employé et bactéries-tests) ainsi que les interactions entre eux sur la production d'agents antibactériens, les niveaux de probabilité (P) sont de l'ordre de (0) (Annexe 4). De ce fait le choix du milieu de culture et des souches actinomycètes contre un microorganisme test est d'une importance capitale et doit être réalisé avec soin. Ce résultat est parfaitement cohérent avec celui obtenu par (**Boussaber et al., 2012**) qui a montré que l'activité antibactérienne dépend en grande partie des bactéries-tests et de la composition des milieux de culture.

Conclusion et perspectives

De nouveaux antibactériens sont absolument nécessaires pour lutter contre le nombre croissant de souches bactériennes résistantes aux antibiotiques. Les produits naturels demeurent la source la plus propice de ces molécules bioactives. Les actinobactéries du genre *Streptomyces* sont à l'origine de la production de 70% des antibiotiques commercialisés.

Durant ces dernières années les chercheurs se sont orientés même vers la recherche des actinomycètes dites rares afin de trouver de nouvelles molécules bioactives.

Dans ce travail, qui entre dans le cadre de la recherche de nouveaux antibiotiques, l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales (trois appartenant au genre *Streptomyces* et une quatrième fait partie du genre *Arthrobacter*) a été mise en évidence vis-à-vis de 14 bactéries-tests (trois provenant de l'ATCC et onze isolats cliniques multirésistants issus de différents prélèvements pathologiques de la clinique pédiatrique d'El Mansoura-Constantine. L'activité antibactérienne a été cherchée par la technique des cylindres d'agar en utilisant quatre différents milieux de culture (Bennett, GBA, GELM et SCA).

Les résultats obtenus montrent que les 04 souches actinomycétales étudiées présentent une activité antibactérienne contre au moins 05 bactéries tests avec un effet remarquable contre les bactéries à coloration de Gram (+). Les plus grandes zones d'inhibition ont été observées avec les souches S2 (45 mm) et S3 (40 mm). La souche S1 semble être meilleure concernant la variété des activités détectées (**85%** des bactéries-tests sont sensibles) suivie respectivement par la souche S2 (**78%**) puis la S3 qui a inhibée (**50%**) et en fin la souche S4 avec (**42%**) de bactéries inhibées.

Le milieu GBA a été sélectionné comme étant le plus favorable pour les souches S1 et S3. Pour la S2, le milieu de Bennett a permis d'obtenir le pourcentage d'activité détectée le plus élevé (**64%**). Le milieu GELM s'est montré le meilleur milieu pour la détection de l'activité antibactérienne chez la souche S4.

L'analyse statistique a révélé l'effet hautement significatif des trois facteurs (souche actinomycétale, milieu de culture et bactérie-test) ainsi que les différentes interactions entre eux.

Notre étude n'est qu'une ébauche et nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi car plusieurs perspectives peuvent être envisagées par exemple :

- ✓ La vérification de l'influence des autres facteurs physicochimiques et d'autres techniques en vue de l'optimisation de la biosynthèse des métabolites d'intérêts médicale.
- ✓ L'extraction, la séparation et l'identification structurale des substances actives.
- ✓ La détermination des concentrations minimales inhibitrices des molécules antibactériennes secrétées (CMI).
- ✓ Le test *in vivo* de la toxicité des antibiotiques sécrétés sur des rats...etc.

Références Bibliographiques

A

Abouwarda A. et Abu El-Wafa W.M. 2011. Production of anti-microbial agents by egyptian *Streptomyces* isolates. *Int.J.Microbial.Res.***2 (1):** 69-73.

Aharonowitz Y., Demain A.L. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **14:** 159-164.

Aouar L. 2006. Mise en évidence des actinomycètes aérobies pathogènes impliqués dans les infections traitées au service des maladies infectieuses du CHU de Constantine. Etude des caractéristiques culturelles des souches isolées et purifiées. Thèse de magistère. Option : Biochimie et Microbiologie appliquée. Université Mentouri, Constantine – Algérie. 3p.

B

Becker B., Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. 1965. Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol*, **13:** 236–43.

Berdy J. 2005. Bioactive microbial metabolites. *J Antibiot (Tokyo)* **58:** 1-26.

Bevilacqua S. 2011. Evaluation de l'impact d'une équipe opérationnelle en infectiologie sur la consommation et le cout des antibiotiques au CHU de Nancy, (Essai d'intervention contrôlé). Thèse de doctorat. Sciences de la vie et de la santé. Université Nancy, France. **18 - 25.**

Bonnet R. 2004. Growing group of extended spectrum β -lactamases: the CTX-M-enzymes. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*. **40: 1 - 14.**

Boughachiche F., Reghioua S., Zerizer H., Boulahrouf A. 2012. Antibacterial activity of rare *Streptomyces* species against clinical resistant bacteria. *Ann Biol Clin*. **70(2),169-74.**

Boughachiche F., Reghioua S., Oulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. et Boulahrouf A. 2005. Isolement d'actinomycetales productrices de substances antimicrobiennes a partir de la sebkhha de Ain Mlila. *Sciences et Technologie*. **23 :** 5-10.

Boukhatem N., Ferhat M., Hadj-Mouhamed R., Lalaoui N. 2015. Prevalance and antibiotic resistance of Staphylococci isolated from Kolea hospital (Algeria). *Journal of Fundamental and applied Sciences*. **7: 260-270.**

Boussaber E., Kadmiri I. M, Hilali L., Hilali A. 2012. Comparaison de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées de milieux variés. *Science Lib Editions Mersenne*. **4 : 1-21.**

Bradfort P. A. 2001. Extended spectrum β -lactamases (ESBL) in the 21st century: Characterisation, epidemiology and detection of this important resistance threat. *Clinical Microbiology Reviews*. **48: 933 - 951.**

C

Calamita H.G., Doyle R.J. 2002. Regulation of autolysins in teichuronic acid Containing *Bacillus subtilis* cells. *Mol Microbiol*. **44: 601-606.**

Chapentier Y., Falk P. et Mayhall C .G. 2000. Vancomycin-resistant enterococci. *Clin. Microbiol. Rev.* **13: 686 - 707.**

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.**

Conton R., Coque T. M. 2006. The CTX - M β -lactamase pandemic. *Current Opinion In Microbiology*. **9: 466-475.**

Chorin A. C. 2009. Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Génie des procédés environnementaux. Institut National Polytechnique de Toulouse. 248.

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

D

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

E

Flårdh K. 2003. Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol.* **6**: 564–71.

G

Gayathri A., Madhanraj P., et Panneerselvam A. 2011. Diversity, Antibacterial Activity And Molecular Characterization of Actinomycetes Isolated From Salt Pan Region of Kodiakarai, Nagapattinam DT. *Asian J. Pharm. Tech.* **1**: 79 - 81.

Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A., Willeke K. 1998. Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl Environ Microbiol.* **4410–4415**.

Goodfellow M. et Williams S. 1983. Ecology of Actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* **37**: 189 - 216.

H

Higgs R.E., Zahn G.A., Gygi J.D. et Hilton M.D. 2001. Rapid method to estimate the presence of secondary metabolites in microbial extracts. *Applied and Environmental Microbiology.* **67**: 371 - 376.

Hilali L, Khattabi A, Nssarllah N, Malki N, Finance C. 2002. Isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir de milieu naturel marocain. *Rev Biol Biotech.* **2**: 49 - 53.

Hodgson D.A. 1992. Differentiation in actinomycetes. *In*: Prokaryotic Structure and Function, Cambridge University Press, Cambridge.

Hugues F. 2008. Pasteur le Mag, N° 5, 44pp.

K

Kitouni M. 2007. Isolement des bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de doctorat d'état Microbiologie appliquée. Université Mentouri de Constantine, Algérie . 176.

Kulkarni S.W. 2003. Role of actinomycètes in environnement. *In* : Kumar A., Bohra C.P., Sing L.K. Envirennement, pollution and mangement. *Publiching Corporation*. 531-541.

ℒ

Lebrihi A., Lamsaif D., Lefebvre G. et Germain, P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Applied Microbiology And Biotechnology*. **37**: 382-387.

Lebrihi A., Lefebvre G., Germain P. 1988. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **28** : 44-51.

Lechevalier H. A., Lechevalier M.P. 1981. Introduction to the order Actinomycetales. *In*: The prokaryotes, Vol. 2, Springer – Verlag, Berlin. **1915 - 1922**.

Levy S. B., Marshall B. 2004. Antibacterial resistance. Worldwide causes, challenges and responses. *Nature Medecine*. **10**: 122-129.

Loqman. S. 2009. La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne: Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de doctorat. Université De Reims Champagne-Ardenne Ecole Doctorale Sciences Exactes et Biologie. 253 pp.

Loucif K. 2011. Recherche des substances antibactériennes à partir d'une collection de souches d'actinomycètes. Caractérisation préliminaire de molécules bioactives. Thèse de magistère. Microbiologie appliquée et biotechnologie microbienne. Université Mentouri-Constantine. Algérie. **139 pp**.

Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G., Germain P. 1995. Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Current Microbiology*. **304 - 311**.

Lozniewski A., Rabaud C. 2010. Résistance bactérienne aux antibiotiques. Fiche conseil pour la prévention du risque infectieux. Centre de Coordination de lute contre les infections nosocomiales-Sud Est.

ℳ

Maier R. M., Pepper I. L., Gerba C. P. 2009. *Environmental Microbiology*. Academic Press: London. **598 pp.**

Mariat F., Sebald M. 1990. Les actinomycètes. *In: Bactériologie médicale*. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

Martín J.F., et Demain A.L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiology Reviews*. **230 - 251.**

Miguélez E.M., Hardisson, C., Manzanal M.B. 1999. Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol.* **145: 515-25.**

Mimoz O. 2003. Impact des résistances bactériennes. Conférences d'actualisation, *Elsevier SAS.* **665 - 672.**

Mukhtar T. A., Koteva K. P., Hughes D. W., Wright G.D. 2001. Vgb from *Staphylococcus aureus* inactivates streptogramin B antibiotics by an elimination mechanism, not hydrolysis. *Biochemistry.* **40: 86-8877.**

O

Ogawara.H. 1981. Antibiotic resistance in pathogenic and producing bacteria with special reference to betalactam antibiotics. *Microbiol. Rev.* **45: 591-619.**

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.**

Osborne M.J. 1969. *Annu. Rev. Biochem.* **38: 501-505.**

P

Petrosyan P., Garcia-Varela M., Luz-Madrigal A., Huitron C. et Floress M.E. 2003. *Streptomyces mexicans* Nov., à xylanolytic microorganism isolated from soil. *Int.Jo. Syst.Evol.Microbial.* **53 : 269-273.**

Philippon A. 2006. Antibiotiques I. cours de bactériologie Générale. Faculté de médecine COCHIN-POR-ROYAL, Université PARIS V. **Podie - Magne N. K.** 1999. Evaluation de la

sensibilité aux antibiotiques des germes les plus fréquemment isolés au laboratoire de bactériologie du CNHU de cotonou. Thèse de doctorat. Université du Mali.

Prakash A., Satyanarayana T., Johri B. N. 2012. *Microorganisms in Environmental Management*. Springer. **819 pp.**

Prescott L. M., Harley. J. P, Klein D.A. 2010. *Microbiologie*. De Boeck : Bruxelles. 2^{ème} Edition. **589 - 603.**

Prescott L. M., Harley J.P., Klein .D.A. 2003. *Microbiologie*. De Boeck & Larcier. Bruxelles. **805 - 825**

R

Rahal K., Missoum M.F., Benslimani A., Ammari H., Aboun A. 2012. Surveillance de la résistance des bactéries aux antibiotiques. 13^{ème} rapport d'évaluation (janvier à décembre 2011). Algérie. **68 - 69.**

Rangaswami. G., Bagyaraj. D. J., Bagyaraj D.G. 2004. *Agricultural Microbiology*. PHI: New Delhi. **440 pp.**

Reponen T.A., Gazenko S.V., Grinshpun S.A., Willeke K., Cole, E.C. 1998. Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl Environ Microbiol*, **64**: 3807-3812.

Reynolds P. E. 1989. Structure, biochemistry and mechanism of action of glycopeptides antibiotics . *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* **9**: **43-950.**

Roger P. et Garcia G. L. 2001. Introduction à microbiologie du sol. Institut Fédératif de Recherche en Biotechnologie Agro Industrielle de Marseille, **193 pp.**

S

Saffroy S. 2006. Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat. Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. Institut National Polytechnique de Lorraine, **196pp.**

Sanchez S., Demain A. L. 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzymes Microbiology Technology*. **31**: **895-906.**

Sateesh V., Naikpatil et Rathod. J. L. 2011. Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *Journal of Ecobiotechnology*. **3: 48 - 53.**

Seoane A., Garcia-Lobo J.M. 2000. Identification of a streptogramin A acetyl transferase gene in the chromosome of *Yersinia enterocolitica*. *Antimicrobial Agents of Chemotherapy*. **45: 905-9.**

Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima M., Nida T. 1993. Studies on actinomycetales producing antibiotics only in agar culture. Screening, taxonomy and morphology productivity relationship of *Streptomyces halstedii* strain. *J Antibiot.* **32: 427-35.**

Sibanda T., Leonard V., Mabinya L.V., Mazomba N., Akinpelu D., Bernard K et al., 2010. Antibiotic Producing Potentials of Three Freshwater Actinomycetes Isolated from the Eastern Cape Province of South Africa. *Int J Mol Sci.* **2612–2623.**

Smaoui S. 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat. Génie de procédés et environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 207p.

Stackebrandt E., Rainey F.A., Ward-Rainey N.L. 1997. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Journal of Systematic Bacteriology.* **47: 479 - 491.**

Strub C. 2008. Modélisation et optimization de la production de thiolutine chez *Saccharothrix alegriensis*. Thèse de Doctorat. Génie des procédés et de l'environnement. Université de Toulouse, France. **221.**

Suganito M., Roderick S. L. 2002. Crystal structure of Vat D: an acetyl transferase that inactivates streptogramin A group of antibiotics. *Biochemistry.* **41: 16-2209.**

Summers A. O. 2006. Genetic linkage and horizontal gene transfer, the roots of the antibiotics multi resistance problem. *Animal Biotechnology.* **17: 125 - 135.**

T

Tortora G.J., Funke B.R. et Case C.L. 2003. La chimiothérapie antimicrobienne. In : Introduction à la microbiologie. Québec : Renouveau pédagogique. **602 - 618.**

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

Tsuda H., Yamashita Y. 2002. Gene involved in bacitracin resistance in *streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents chemother.* **46**: 64 - 3756.

V

Ventura M., Canchaya C., Tauch A., Chandra G., Fitzgerald G.F., Chater K.F et al., 2007. Genomics of Actinobacteria: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, **71**: 495 - 548.

Voelker F. et Altaba S. 2001. Nitrogen source governes the pattren of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbial* **147**: 2447-2459.

W

Waksman. S. A. 1961. The actinomycetes. vol. I: Nature Occurrence and Activity. WAVERLY PRESS, INC : Baltimore. Pp : 327

Walsh C. (2003). Natural and produced immunity versus acquired resistance. **In**: antibiotics ; actions, origins, resistance. Ed. ASM press, Washington. **91-106**.

Wang L., Huang Y., Liu Z., Goodfellow M., Rodriguez C. 2006. *Sreptacidiphilus oryzae* sp. nov. an actinomycete isolated from rice-field soil in Thailand. *In. J. Sys. Ev. Microbiol.* **56**: 1257 - 1261.

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

Y

Yala D., Merad A. S., Mohamed D., Ouar Korich M. N. 2001. Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine de Maghreb.* N° **91**.

Z

Zhi X.Y., Li W.J., Stackebrandt E. 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence - based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol.* **59: 589 - 608.**

Zmahoun, C. 2005. Evaluation de la sensibilité aux antibiotique des bactéries isolées des infections urinaires au laboratoire de bactériologie du centre national hospitalier universitaire-Hubert koutoukou Maga (C.N.H.U.H.K.M) .Thèse de doctorat d'état ,Université du Mali. 91.

Zvyagintsev D. G., Zenova G. M., SudnizinI., Doroshenko E. A. 2005. The Ability of Soil Actinomycetes to Develop at an Extremely Low Humidity. **405 : 461-463.**

Annexe 1

Composition des milieux de culture utilisés

- **Milieu de Bennett**

D-Glucose anhydre	10g
Casaminoacides	2g
Extrait de levure.....	1g
Extrait de viande	1g
Agar.....	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,3

- **Milieu GBA**

Glycérol.....	20g
Amidon soluble.....	20g
Peptone	10g
Extrait de viande.....	5g
CaCO ₃	3g
Agar	15g
Eau distillée	1000 ml

pH = 7,0

- **Milieu GELM**

Extrait de Malt	10g
Extrait de levure.....	4g
Glucose.....	4g

Agar20g
Eau distillée1000 ml

pH = 7,2

- **Milieu SCA**

Glycérol.....30g
Saccharose.....2g
NaNO₃.....2g
K₂HPO₄.....1g
MgSO₄..... 0,5g
KCl.....0,5g
L-asparagine.....0,5g
FeSO₄.....0,01g
Agar.....15g
Eau distillée 1000ml

pH : 7,3

- **Milieu Muller-Hinton**

Infusion de viande300 g
Hydrolysate de caséine17,5 g
Amidon..... 1,5 g
Agar17 g

pH = 7,4

- **Milieu Gélose nutritive (ordinaire)**

Extrait de viande..... 1g

Extrait de levure..... 2,5g

Petone.....5g

Chlorure de Sodium.....5g

Agar.....15g

Eau distillée.....1000ml

pH=7,0

- **Bouillon nutritif**

Extrait de viande.....3g

Peptone.....5g

Eau distillée1000 ml

pH=6,8

- **Eau physiologique**

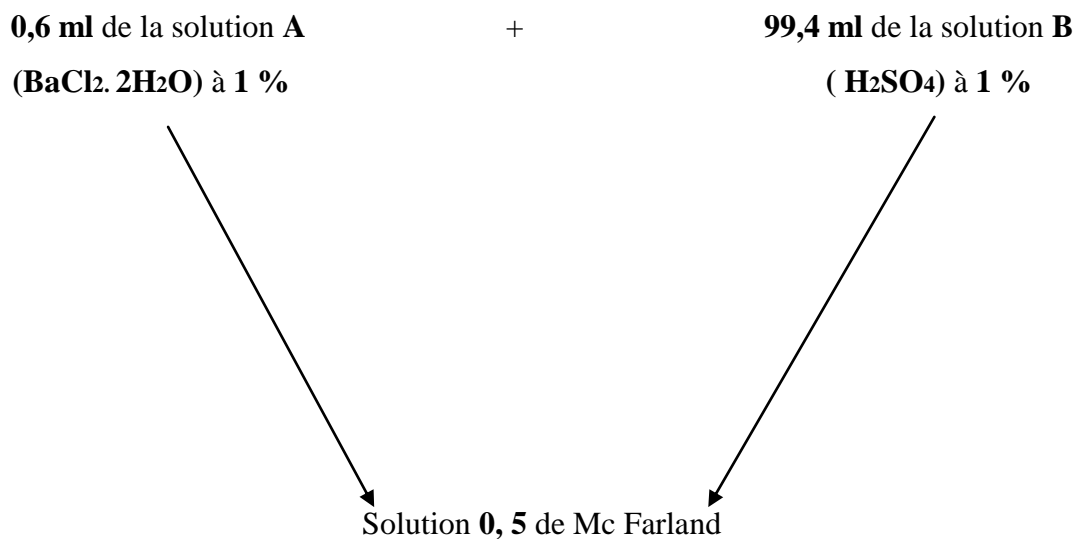
NaCl9g

Eau distillée.....1000 ml

Annexe 2

Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland

1/ Préparation de la solution 0,5 de Mc Farland (Chessbrough, 2000)



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

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

1/ à l'obscurité

2/ Température de conservation : 20-25 °C

3/ Durée de conservation : 6 mois

Annexe 3

Analyse de la variance des effets de la souche productrice, de la souche-test et du milieu de culture sur l'apparition des activités antimicrobiennes

Facteur	Effet dl	Effet MC	F	Niveau p
1*	3	1,867560	290,1639	0,000000
2*	3	1,867560	674,8651	0,000000
3*	13	1,867560	95,0360	0,000000
12*	9	1,867560	246,4433	0,000000
13*	39	1,867560	67,1850	0,000000
23*	39	1,867560	71,8299	0,000000
123*	117	1,867560	78,8264	0,000000

(*) Effet significatif, (1) Souche, (2) Milieu, (3) Microorganisme-test, (MC) Sommes des carrés moyennes, (dl) Degrés de liberté, (F) Statique du test de Fisher, (p) Probabilité attachée à la valeur de Fisher.

Abstract

As part of the search for new antibiotics produced by actinomycetes, studying the antibacterial activity of four original Saharan Actinomycetals strains was performed.

The activity test was carried out against three (03) bacteria from the American Type Culture Collection and eleven (11) clinical bacteria.

Production of antibacterial was investigated by an agar diffusion technique (technical agar cylinders), by culturing the actinomycetes strains on four different media (Bennett, GBA, GELM and SCA).

The four Actinomycetals strains have shown activity against at least five tests bacteria. The larger zones of inhibition were observed with S2 and S3 strains.

The GBA medium was selected as the most favorable qualitatively for S1 and S3 strains. For the S2 strain, the Bennett medium has achieved the highest percentage of activity detected (64%). The GELM environment proved to be the best medium for detecting antibacterial activity in strain S4.

Keywords: *Streptomyces*, *Arthrobacter*, Saharan soil, antibacterial activity, resistance bacterial.

ملخص

في إطار البحث عن مضادات حيوية جديدة منتجة من طرف بكتيريا الاكتينومييسات، تمت دراسة النشاط المضاد للبكتيريا لأربعة سلالات من الاكتينومييسات معزولة من تربة صحراوية و مزروعة في خمسة أوساط مغذية (SCA, GBA, Bennett, GELM) بواسطة تقنية الانتشار داخل أوساط الزرع الصلبة (تقنية اسطوانات الاجار)

تم اختبار النشاط المضاد للبكتيريا ضد ثلاثة (03) بكتيريات مصدرها المجموعة الامريكية للزرع النوعي (ATCC) و احد عشر بكتيريا اكلينيكية.

أثبتت جميع السلالات المدروسة قدرتها على تثبيط خمسة بكتيريا على الأقل مع تسجيل اكبر منطقة تثبيط للسلالتين S2 و S3.

اختير وسط الزرع GBA كأحسن وسط لإنتاج المضادات الحيوية كما بالنسبة للسلالتين S1 و S3 و وسط الزرع Bennett سمح بتسجيل اكبر نسبة مؤوية للنشاط المضاد للبكتيريا بالنسبة للسلالة S2، اما بالنسبة للسلالة S4 فقد اختير وسط الزرع GELM كأحسن وسط للكشف عن النشاط المضاد للبكتيريا.

كلمات مفتاحيه : *Streptomyces* ، *Arthrobacter* ، تربة صحراوية ،النشاط المضاد للبكتيريا ،المقاومة البكتيرية .

Mesbah Amina Mansouri Ahlam	Date de soutenance : 02/07/2015									
Nature de diplôme : Master en microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes										
<p style="text-align: center;">Thème :</p> <p style="text-align: center;">Étude de l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales d'origine saharienne</p>										
<p>Résumé</p> <p>Dans le cadre de la recherche de nouveaux antibiotiques élaborés par les actinomycètes, l'étude de l'activité antibactérienne de quatre souches actinomycétales d'origine saharienne a été réalisée. Le test d'activité a été effectué contre trois bactéries provenant de l'American Type Culture Collection et onze bactéries cliniques.</p> <p>La production d'antibactériens a été recherchée par une technique de diffusion sur gélose (technique des cylindres d'agar), en cultivant les souches actinomycétales sur quatre milieux de culture différents (Bennett, GBA, GELM et SCA).</p> <p>Les quatre souches actinomycétales ont montrées une activité contre au moins cinq bactéries tests. Les plus grandes zones d'inhibition ont été observées avec les souches S2 et S3.</p> <p>Le milieu GBA a été sélectionné comme étant le plus favorable qualitativement pour les souches S1 et S3. Pour la souche S2, le milieu de Bennett a permis d'obtenir le pourcentage le plus élevé d'activité détectée (64%). Le milieu GELM s'est montré le meilleur milieu pour la détection d'activité antibactérienne chez la souche S4.</p> <p>Mots clés : <i>Streptomyces</i>, <i>Arthrobacter</i>, sol saharien, activité antibactérienne, résistance bactérienne.</p>										
<p>Laboratoire de recherche : Laboratoire de Génie microbiologique et applications / département des Sciences de la Nature et de la Vie, Université Frères Mentouri Constantine.</p>										
<p>Jury d'évaluation :</p> <table border="0" style="width: 100%;"> <tr> <td data-bbox="129 1758 638 1803">Présidente : Mme Kitouni-Oulmi L.</td> <td data-bbox="638 1758 1197 1803">Maitre de conférences classe B</td> <td data-bbox="1197 1758 1455 1803">UFM Constantine</td> </tr> <tr> <td data-bbox="129 1803 638 1848">Rapporteur : Mme Diabi-Rghioua S.</td> <td data-bbox="638 1803 1197 1848">Maitre assistante classe A</td> <td data-bbox="1197 1803 1455 1848">UFM Constantine</td> </tr> <tr> <td data-bbox="129 1848 638 1892">Examineur : Mme Mergoud L.</td> <td data-bbox="638 1848 1197 1892">Maitre assistante classe A</td> <td data-bbox="1197 1848 1455 1892">UFM Constantine</td> </tr> </table>		Présidente : Mme Kitouni-Oulmi L.	Maitre de conférences classe B	UFM Constantine	Rapporteur : Mme Diabi-Rghioua S.	Maitre assistante classe A	UFM Constantine	Examineur : Mme Mergoud L.	Maitre assistante classe A	UFM Constantine
Présidente : Mme Kitouni-Oulmi L.	Maitre de conférences classe B	UFM Constantine								
Rapporteur : Mme Diabi-Rghioua S.	Maitre assistante classe A	UFM Constantine								
Examineur : Mme Mergoud L.	Maitre assistante classe A	UFM Constantine								