



---

Année Universitaire : 2013-2014

**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne**  
**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**  
Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

Titre  
**Isolement des souches d'actinomycète  
Productrices des substances antimicrobiennes**

Présenté par :

**LOUBNA SEFIANE**

Encadré par :

**Pr. KHALID SENDIDE**

Co-encadrant à la FST-Saiss :

**Pr. SAMIR ANANOU**

Co-encadré par :

**Mr. JAOUAD ANISSI**

Soutenu le : 23 Juin 2014

devant le jury composé de :

- Pr. Bekhti Khadija
- Pr. El Hassouni Mohammed
- Pr. Khalid Sendide
- Pr. Samir Ananou

**Stage réalisé au Laboratoire de Biotechnologie à L'Université AL AKHAWAYN**  
Faculté des Sciences et Techniques de Fès



---

## Remerciements

Je tiens à exprimer en premier, ma profonde gratitude et mes vifs remerciements à Monsieur KHALIDE SENDIDE, directeur du laboratoire de Biotechnologie à L'Université Al Akhawayen, de m'avoir donné la chance de travailler sur un sujet aussi passionnant et pour ses conseils, son aide et sa disponibilité qui ont permis à la concrétisation de ce travail.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent également à Monsieur SAMIR ANNANOU, Professeur à faculté des Sciences et Techniques de Fès, pour avoir accepté d'encadré ce modeste travail.

Mes remerciements s'adressent à Monsieur ANISSI JAOUAD, Pour la confiance qu'il m'a accordée durant la période du stage et pour ses précieux conseils, et ses encouragements et pour son aide précieuse durant la réalisation de ce travail

Je remercie également Le Professeur Monsieur EL HASSOUNI MOHAMME et Le Professeur Madame BEKHTI KHADIJA, d'avoir accepté de juger ce travail.

Des remerciements particuliers s'adressent à notre responsable de filière à la faculté des sciences et techniques de Fès Monsieur HAGGOU ABEDLATIF pour son soutien continu

Enfin, je remercie tous ceux qui m'ont aidé et ont contribué de près ou de loin à la réalisation de ce travail.



---

## Résumé

29 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sol. L'identification macroscopique des isolats montre une variété des caractères morphologiques, 10 isolats sont caractérisés par PCR donnent un seul produit d'amplification d'environ 1400 pb. L'analyse RFLP est effectuée sur les produits de PCR obtenus pour les 10 isolats par l'enzyme de restriction Alu I permet d'obtenir différents profils.

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes a été déterminé par la méthode de gélose molle contre deux bactéries Gram positives (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et 2 Gram négatives (*Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi*) à deux températures d'incubation de 30°C et 37°C. Parmi les 29 isolats, 17 souches ont montré une activité contre au moins une bactérie tests étudiées. Les isolats semblent être plus actifs sur les bactéries à Gram positifs que sur les bactéries à Gram négatifs; la température de 30°C favorise bien la production des métabolites secondaires biologiquement actifs.

Ces isolats ont été cultivés par culture liquide afin de produire des extraits riches en métabolites secondaire à partir du surnageant.

L'extrait 304 a été choisit suite à son activité antibactérienne remarquable pour la production d'une molécule antibactérienne. La production a été faite sur le milieu CS liquide et la purification a été réalisée par les méthodes chromatographiques. Cette molécule a montrée une activité prometteuse contre *B. subtilis* et *S. aureus* avec des CMI (concentration minimale inhibitrice) de 14.3 µg/ml et 35.2 µg/ml.



---

## Abstract

29 actinomycetes from soil samples were isolated. Macroscopic identification of the isolates showed variety of morphological characters, 10 isolates were characterized by PCR amplification give a product of about 1400 bp. RFLP analysis using the restriction enzyme Alu I, allow to obtain different profiles. The antimicrobial activity of actinomycete isolates was determined by the soft agar method against both, Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*) and two gram-negative (*Escherichia coli* and *Erwinia chrysanthemi*) at two incubation temperatures of 30°C and 37°C. 17 out of 29 isolates showed activity against at least one bacterium tests. Isolates appear to be more active against Gram-positive bacteria, than Gram-negative bacteria; temperature of 30°C promotes the production well biologically active secondary metabolites.

These isolates were grown in liquid culture to produce extracts rich in secondary metabolites from the supernatant.

The extract from the isolate CA304 was chosen, because of its remarkable antibacterial activity, for the production and purification of an antibacterial molecule. Production was performed on the liquid medium and the CS purification was carried out by chromatographic methods. This molecule has showed promising activity against *B. subtilis* and *S. aureus* with MIC (minimal inhibitory concentration) of 14.3 µg/ml and 35.2 µg/ml.



## ملخص

تم عزل تسعة و عشرون سلالة من البكتيريا الإشعاعية من خلال عينات التربة أوضح تحديد الصفات بالعين المجردة لسلالات مجموعة من الصفات المورفولوجية تفاعل سلسلة البر ملة لعشر سلالات أعطى منتج وحيد لتضخيم الحمض النووي 1400 زوج قاعدة تحاليل تجزئ طول تعدد الأشكال لنواتج تفاعل البر ملة للحمض النووي بازيم لتجزئ لعشر سلالات مكن من الحصول على مجموعة مختلفة من الملامح إنتاج لمضادات الحيوية ل29 بكتيرية الإشعاعية المعزولة ضد اثنين من البكتيريا ايجابية الجرام و اثنين من البكتيريا سالبة الجرام باثنين من درجة الحرارة الحضانة 30 و 37 درجة مئوية سبعة عشرة من البكتيريا المعزولة أظهرت نشاط ضد واحد على الأقل اختبارات البكتيريا المدروسة اظهر البكتيرية الإشعاعية نشاطا أكثر على البكتيريا ايجابية الجرام من البكتيريا سالبة الجرام؛ درجة الحرارة ثلاثون مئوية افصل لإنتاج المركبات الثانوية النشطة بيولوجيا. زرعت البكتيريا الإشعاعية لمعزولة فالوسط المائي لإنتاج خلاصات غنية بالمركبات الثانوية اختيار المستخلص 304 بسبب نشاطه المضاد للبكتيريا الملفت للنظر لإنتاج جزيئه مضادة للبكتيريا تم لإنتاج في الوسط المائي و تمت التنقية عن طريق الوسائل الكروماتوغرافية أظهرت الجريئة نشاطا واعداد ضد المكورات العنقودية و العصوية الرقيقة الذهبية بمركز منع حد ادني 14 و 35,2 ميكروغرام لكل ميليمتر



## **Table des matières**

LISTE DES ABREVIATIONS .....	i
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX.....	ii
INTRODUCTION.....	3
<b>I. ACTINOMYCETES .....</b>	<b>4</b>
1. Définition .....	4
2. Convergence et divergence entre Actinomycètes et bactéries.....	5
3. Biologie et développement.....	5
a) Mycélium de substrat et mycélium aérien .....	6
b) Formation des spores .....	7
4. Physiologie et métabolisme des actinomycètes : .....	9
5. Génétique des actinomycètes.....	10
6. Classification des Actinomycètes .....	10
a) Les Mycobacteriacées .....	10
b) Les Actinomycétacées.....	11
c) Les Streptomycétacée .....	11
a) Les Actinoplanacées : .....	11
7. Ecologie des actinomycètes .....	12
8. Importance biotechnologique des actinomycètes .....	14
<b>II. PRODUCTION DES METABOLITES BIOACTIFS DES ACTINOMYCETES: .....</b>	<b>16</b>
1. Les antibiotiques .....	16
2. Classification des antibiotiques.....	16
3. Régulation de la biosynthèse des antibiotiques.....	17
A. Influence des sources nutritionnelles .....	17
➤ Effet de la source de carbone .....	17
➤ Effet de la source d'azote.....	18



---

B.	Régulations par les paramètres environnementaux .....	19
III.	MATERIEL ET METHODES .....	20
1.	Echantillonnage du sol .....	20
2.	Isolement des souches d'actinomycètes .....	20
3.	Identification macroscopique des isolats d'actinomycètes .....	20
4.	Conservation des souches d'Actinomycètes.....	21
5.	Extraction d'ADN génomique des isolats d'actinomycètes .....	21
6.	Amplification de l'ADNr 16S par PCR .....	21
7.	Analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose.....	22
8.	Analyse RFLP Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism).....	22
9.	Test d'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes .....	23
A.	Préparation de l'inoculum.....	23
10.	Cinétique de production des molécules bioactives .....	24
11.	Effet de la source de l'azote inorganique sur la production des molécules antibactériennes :.....	24
12.	Production et préparation d'extraits riches en métabolites secondaires : .....	25
13.	L'effet de la concentration en amidon sur la production du métabolite secondaire à effet antibactérienne. ....	25
14.	Chromatographie liquide.....	25
15.	Chromatographie sur couche mince.....	26
IV.	RESULTATS .....	27
1.	Isolement des souches d'actinomycètes: .....	27
2.	PCR des fragments d'ADN 16S des isolats d'actinomycètes et électrophorèse sur gel d'agarose .....	29
3.	Analyse RFLP des isolats d'actinomycètes par électrophorèse sur gel d'agarose....	29
4.	PRODUCTION ET EXTRACTION DE METABOLITES SECONDAIRES :.....	30
A.	Criblage de l'activité antibactérienne à différentes températures. ....	30
B.	Cinétique de production d'antibiotique.....	32
C.	Effet de la source d'azote inorganique sur la production des antibactériens.....	33
5.	Activité antibactérien des extraits des isolats d'actinomycètes .....	35



---

6. Activité antibactériens des extraits de l'isolat CA304 sur milieu CSA à différentes concentrations d'amidon .....	36
D. Fractionnement et criblage de l'extrait pour l'activité antibactérienne .....	37
V. DISCUSSION.....	39
VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES .....	43
VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....	44
VIII. Annexes .....	56
Résumé .....	66



---

## **LISTE DES ABREVIATIONS**

<b>ADN :</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>ATB :</b>	Antibiotiques
<b>CSA :</b>	Starch Casein Agar
<b>CCM :</b>	Chromatographie sur couche mince
<b>CMI :</b>	Concentration minimale inhibitrice
<b>DO :</b>	Densité optique
<b>ED :</b>	Enzyme de restriction
<b>G- :</b>	Gram négatif
<b>G+ :</b>	Gram positif
<b>ED :</b>	Eau distillé
<b>EDS :</b>	Eau distillé steril
<b>GC :</b>	Guanine, cytosine
<b>Milieu LB :</b>	Lysogeny broth
<b>Milieu MH :</b>	Mueller-Hinton
<b>PCR :</b>	Polymerase chain reaction
<b>RFLP:</b>	Restriction fragment length polymorphism
<b>Rpm:</b>	Rotation per minute
<b>TAE :</b>	Tris, Acétate, EDTA
<b>UV :</b>	Ultraviolet



---

## **LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX**

Figure 1: Cycle de développement des Actinomycètes sur milieu solide (Hopwood et al, 1985)

Figure 2 : Une colonie du genre *Streptomyces* sur milieu solide (Dvorak, 1999)

Figure 3 : Distribution verticale des actinomycètes dans le sol (Iwai et Takashi 1992)

Figure 4: Exemples d'isolats d'Actinomycètes sur milieu CSA

Figure 5: (A) : marqueur de taille utilisé, (B) : électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des isolats d'actinomycètes

Figure 6: (A) : électrophorèse sur gel d'agarose montrant les profils RFLP des différents fragments d'ADN 16S, (B) : RFLP du fragment d'ADN 16S de l'isolat CA49 par

Figure 7: Les zones d'inhibition provoquées par les isolats actives sur les germes testés

Figure 8 : Cinétique de production d'antibiotique des 4 isolats d'actinomycètes à 30°C et 37°C

Figure 9 : Effet de la source d'azote inorganique sur l'activité de l'isolat CA304 sur *B.subtilis*

Figure 10: Activité des extraits métaboliques de l'isolat CA304

Figure 11 : CCM des différentes fractions collectées durant la chromatographie liquide

### **LISTE DES TABLEAUX:**

Tableau 1: Les principaux genres d'Actinomycètes

Tableau 2: Caractéristiques des souches à indicatrices

Tableau 3 : Répartition des isolats selon le site et Caractères morphologiques des souches d'Actinomycètes

Tableau 4 : Résultats D'activité antibactérienne des souches isolées d'actinomycètes sur 4 souches testées. Les valeurs numérisées le tableau montrent les diamètres d'inhibition en (mm).

Tableau 5: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes en fonction des milieux de production

Tableau 6: Diamètre d'inhibition (mm) des extraits sur les souches testées



## INTRODUCTION

Depuis l'avènement des antibiotiques, une nette amélioration de la qualité et de la durée de vie a été constatée (Boughachiche et al., 2005). Cependant, leur utilisation intensive a eu pour conséquence l'adaptation des bactéries à ces remarquables substances (Dietera et al., 2003).

La résistance bactérienne aux antibiotiques n'est pas un phénomène récent puisqu'elle a été évoquée peu après leur introduction en médecine humaine. Depuis l'apparition des premiers agents anti-infectieux tels que les pénicillines et les sulfamides, les bactéries n'ont pas cessé de s'adapter à l'environnement imposé par l'utilisation massive de ces substances (Ploy et al., 2000; Russell et al., 2000) et aujourd'hui nous sommes confrontés à une remontée croissante du nombre de souches bactériennes résistantes à tous les antibiotiques disponibles sur le marché et la résurgence de maladies infectieuses que l'on croyait parfaitement maîtrisées (Données OMS, 1997). Ces constats expliquent l'urgence de disposer de nouvelles molécules d'antibiotiques.

Ce qui fait, de la recherche et le développement de nouvelles molécules bioactives un des défis les plus importants pour l'humanité au 21<sup>ème</sup> siècle. La résistance aux antibiotiques est un problème universel, qui semble plus aigu dans certains pays en voie de développement du fait de la monotonie des antibiotiques utilisables. Toutes les espèces ou genres bactériens sont concernés par le phénomène de la résistance aux antibactériens posant parfois de véritables problèmes thérapeutiques. Parmi ces derniers on peut recenser plusieurs souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA) (Poly et al., 1998), ainsi que des souches de *Mycobacterium tuberculosis* (Livermore, 2004)

Vue la complexité de la structure chimique des antibiotiques, le moyen le plus utilisé pour la recherche de nouvelles molécules actives est le moyen naturel qui consiste à chercher ces molécules, notamment à partir de bactéries de la famille des Actinomycètes.

En effet, plus de cinquante antibiotiques différents ont été détectés dans le genre de *Streptomyces*, dont compris la streptomycine, la néomycine, le chloramphénicol et les tétracyclines (Marinelli F. 2009)

La présente étude a pour objectifs principaux l'isolement et l'identification des actinomycètes à partir du sol et la caractérisation de leurs molécules à activité antibactérienne.



---

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

### I. ACTINOMYCETES

Les Actinomycètes ont été isolés pour la première fois par Cohn en 1875 à partir de sources humaine, et c'est en 1943 que Waksman a pu isoler un genre Actinomycète à partir du sol. Waksman divise en quatre grandes catégories l'histoire des Actinomycètes. La première, est celle de la découverte de leur rôle dans la pathologie et va de 1874 aux années 1990. La seconde période (1900-1919) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des Actinomycètes du sol, avec les travaux de Kraisky, de Cohn, de Waksman et de Curtis. C'est ensuite la période (1919-1940) au cours de laquelle une meilleure connaissance des germes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, de Lieske, de Krassilnikov, entre autre.

La dernière époque historique, enfin, est celle des antibiotiques produits par les Actinomycètes. Elle commence en 1940 et le nom de Selman Waksman lui est indissolublement lié (Williams et al., 1984).

#### 1. Définition

Etymologiquement, le mot Actinomycète a été dérivé des mots grecs « Aktis » qui veulent dire rayon et « mykes » qui veut dire champignon. Les Actinomycètes ont été considérés comme un groupe intermédiaire entre bactérie et champignon. Maintenant, ils sont reconnus comme des organismes procaryotes. Pourtant, ces microorganismes présentent des similitudes à la fois avec les bactéries et avec les champignons.

Les actinomycètes se situent dans l'ordre des Actinomycetales (Mariat et Sebald 1990). Les bactériologistes considèrent les actinomycètes comme des bactéries tandis que les mycologistes les considèrent comme des champignons (Gottlieb, 1973). Aujourd'hui, ce problème est résolu et ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les bactéries (Becker et al. 1965 ; Lechevalier et al., 1981)

Les Actinomycètes ont souvent été confondus avec les champignons, du fait de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent et aussi de leur morphologie fongicoïde : filaments ramifiés, organes de sporulation, etc. Leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques. Les rangent parmi les procaryotes



## 2. Convergence et divergence entre Actinomycètes et bactéries

Des caractères rapprochent les Actinomycètes des bactéries : procaryotes, une morphologie typiquement bactérienne chez les formes simple (Mycobacteriacées). Cependant, il existe trois points qui rapprochent les Actinomycètes des champignons (Alexander, 1961):

- Structure mycélienne présentant des ramifications chez les Actinomycètes typiques avec toutefois cette différence que les filaments ont un diamètre deux fois plus faible que ceux des champignons, d'où le terme de pseudo mycélium parfois employé pour désigner cette structure ;
- Formation fréquente d'un mycélium aérien et de conidies ;
- En culture, absence de la turbidité caractéristique des bactéries unicellulaires et apparition des amas de cellules.

Les analogies entre les Actinomycètes et les champignons sont en fait superficielles ; il s'agit d'une convergence de forme plutôt que d'une parenté génétique, car une différence fondamentale les sépare: les Actinomycètes sont procaryotes alors que les champignons sont eucaryotes.

## 3. Biologie et développement

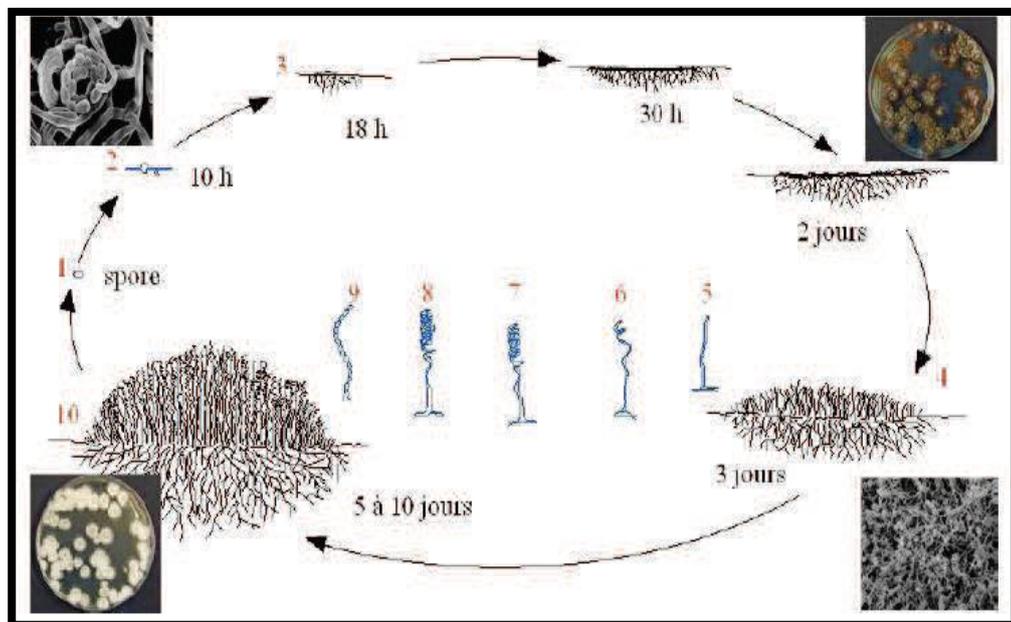
Les actinomycètes se caractérisent par une diversité morphologique importante : de simples bacilles diphtéroïdes (la plupart des mycobactéries) à des formes mycéliennes complexes comme le genre *streptomyces* à (Gottlieb, 1973). Cette variabilité morphologique s'accompagne souvent d'une différenciation importante avec un cycle biologique comparable à celui de certains Eucaryotes. Certains peuvent présenter un mycélium se développant sur et

Dans les milieux (mycélium végétatif) ou dans l'air au-dessus du substrat (mycélium aérien). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées en chaînes ou même enfermés dans un sporange. D'autres actinomycètes forment un mycélium non persistant rapidement transformé en une masse de forme bactériode irrégulier, et enfin d'autres ne présentent que des mycéliums très rudimentaires au point d'être inexistantes (Mariat et Sebald, 1990 ; Lacey, 1997)

La structure mycélienne des actinomycètes est typique, mais quelquefois transitoire. Le mycélium rampant et /ou aérien subit une évolution complexe donnant naissance à des structures spécialisées, conidies ou sporanges, qui libèrent des spores de formes variées (Miguélez et al; 2000)

#### a) Mycélium de substrat et mycélium aérien

Les actinomycètes possèdent une structure de procaryotes mais un cycle biologique semblable à certains champignons (Sanglier et Trujillo, 1997).

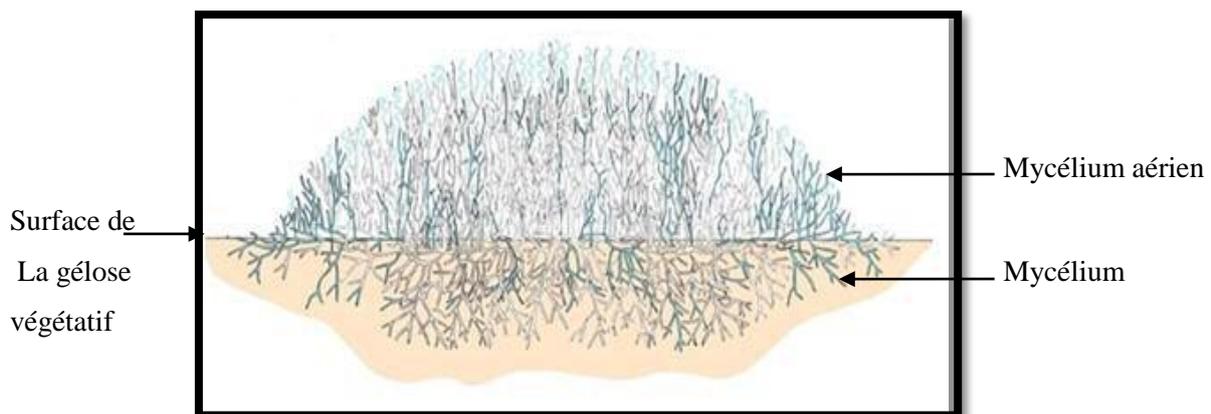


**Figure 1: Cycle de développement des Actinomycètes sur milieu solide (Hopwood et al. 1985)**

Le mycélium du substrat ou mycélium primaire (ou encore végétatif) se développe à partir du tube des spores. La germination des spores comprend quatre étapes l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance, pour lesquelles le degré hygrométrique joue un rôle important, parfois l'activation peut être déclenchée par un choc thermique par exemple un traitement de 5 minutes à 50°C pour les spores de *Streptomyces viridochromogenes*. Puis le tube de germination croît et donne des hyphes qui se ramifient de manière apicale, l'ensemble de la colonie se développant de manière radiale. Le mycélium ramifié forme des parois transversales, isolant les zones les plus âgées. C'est le cas des *Sporoactinomycetes* ; le mycélium primaire est ancré dans le support solide dans lequel il puise ses nutriments.

Cette aptitude de formation de mycélium du substrat montre la capacité des actinomycètes à dégrader la matière organique insoluble grâce à leurs enzymes extracellulaires (Locci, 1976).

Sur le mycélium primaire se développe un mycélium aérien ou secondaire, composé d'hyphe, dressés sur le mycélium du substrat, Ils sont enfermés dans une enveloppes externe hydrophobe, Une fois développé le mycélium aérien couvre les colonies, dont le diamètre est de 1 à 4 mm. L'aspect des colonies est compact, sec, lisse ou rugueux en chou-fleur à contours lisse ou échancré. Elles sont très souvent pigmentées en blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc. Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas des cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses (Perry *et al.* 2004).



**Figure 2 : Une colonie du genre Streptomyces sur milieu solide (Dvorak, 1999)**

La production de mycélium aérien est influencée par plusieurs facteurs notamment ; la composition du milieu de croissance la température d'incubation et la présence de composé stimulant spécifiquement le mycélium du substrat est aérobic facultatif. Par contre, le mycélium aérien est aérobic strict (Silvey *et al.*, 1975)

### **b) Formation des spores**

Les différentes groupes d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certains hyphes pour former des conidies, un peu plus résistantes aux conditions hostiles que les hyphes, soit en produisant des endospores hautement résistantes à la chaleur et autres adversités.

#### **➤ Les endospores :**

Elles naissent d'une organisation du cytoplasme avec formation d'une nouvelle paroi dans l'hyphe.



Dans ce groupe une subdivision supplémentaires est réalisée en fonction du mode de formation de la nouvelle paroi (Locci et Sharples 1984) On parle ainsi de sporulation entérothallique caractéristique des genres *Planomonospora* lorsque la nouvelle paroi se forme entre la membrane cytoplasmique et la paroi de l'hyphe parentale.

On parle de sporulation holothallique caractéristique du genre *Thermoactinomyces* lorsque la nouvelle paroi qui délimite la spore provient au moins en partie de toutes les couches partielles de l'hyphe parentales, recouverte ou non d'une enveloppe

Les endospores sont produites par des actinomycètes thermophiles et sont semblables morphologiquement et chimiquement. Elles contiennent une paroi externe épaisse multicouche et résistante qui enveloppe le cortex la membrane cytoplasmique, le cytoplasme, les ribosomes et le nucléoïde.

#### ➤ Les exospores

Elles naissent de la formation de parois transversales à partir des hyphes existantes. Une subdivision supplémentaire est également réalisée selon la présence ou l'absence d'une enveloppe qui recouvre la paroi de l'hyphe sporogène.

Ainsi, la formation d'exospores par fragmentation d'hyphes avec enveloppe est la plus fréquente et se retrouve notamment chez *Actinoplanes* et *Streptomyces*. La formation d'exospores par fragmentation d'hyphes du substrat sans enveloppe se rencontre avec *Micromonospora*.

Les conidies peuvent suivant les groupes être produites à l'isolement (*Micromonospora*) deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînes (*Actinomadura*), et /ou en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, sinuées ou en spirales. De plus, elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores (*Streptoverticillium*).

Ces exospores contiennent la plupart des éléments du mycélium primaire: un seul nucléoïde correspondant à un seul génome haploïde pour les spores de *streptomyces*. Des ribosomes dissociables en sous unités 30S et 50S ; un système membranaires intra cytoplasmique, des vacuoles, une membrane cytoplasmique, une paroi plus épaisse qui peut contenir jusqu'à trois couches.



#### 4. Physiologie et métabolisme des actinomycètes :

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram positive, aérobies plus rarement anaérobies. Les premiers à métabolisme oxydatif représentent les espèces telluriques, les seconds à métabolisme fermentatif correspondant aux espèces parasites saprophytes de la cavité buccale éventuellement pathogènes pour l'homme (cas d'*Actinomyces*). Ce sont généralement des organismes hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophique (Ensign et al. 1993). Ils ont des exigences réduites et tirent leur énergie à partir d'une source très variée de substrats azotés et carbonés. En conséquence, ils sont très largement distribués dans la nature. Certaines ont des exigences nutritionnelles telles que les vitamines et certains acides aminés. Elles tendent à croître lentement comme des filaments ramifiés (0,5-1,0 $\mu$ m de diamètre) (Eunice, 1983). Leur croissance avec un temps de génération moyen de 2 à 3 heures, est plus lente que celle des autres bactéries (Larpen et Sanglier, 1989).

Les Actinomycètes sont fréquemment bactériolytiques grâce à des enzymes hydrolytiques capables de fragmenter les peptides de la paroi, leurs propriétés anti microbienne sont aussi bien connues et un bon nombre d'antibiotique sont produits lors de leur croissance. L'équipement enzymatique des actinomycètes est très diversifiés, il est à l'origine du rôle écologique majeur de ces organismes. Leurs variétés et leur importance quantitative, dépendent de nombreux facteurs comme le pH, la matière organique, les saisons, traitement agricole, etc. Les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, ils sont généralement mésophiles, d'autres sont thermophiles tolérants des températures avoisinant 50°C et peuvent aller jusqu'à 60°C (Goodfellow et Williams 1983). La majorité des actinomycètes croient dans des conditions humides mais aérobies et peuvent se développer dans des endroits où l'activité de l'eau est très basse (Davies et Williams, 1970, Goodfellow et Williams, 1983).

Certaines espèces d'actinomycètes sont dotées d'un pouvoir pathogène marqué on cite à titre d'exemple les suivants: *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis* sont respectivement les agents de la tuberculose humaine ou bovine. *Les Nocardia* sont aussi des agents redoutables des nocardiose humaine ou animale.



## 5. Génétique des actinomycètes

La taille de l'ADN des actinomycètes est de 3.7 Méga Daltons c'est à dire deux fois celui de *E. coli*, la durée de réplication de l'ADN est de 50 à 65 minutes. Les bactéries actinomycétales possèdent un remarquable degré de variabilité génétique due à des réarrangements du génome à cause de plusieurs types de mutations essentiellement chromosomiques, les plasmides peuvent aussi être sujets à des réarrangements. A la suite de croisements des actinomycètes, des parties du chromosome de la souche donneuse peuvent devenir plasmides dans la souche receveuse (Larpent *et al*, 1989).

Les genres d'actinomycètes peuvent être définis par l'étude du coefficient de Chargaff ou GC % qui représente le nombre de paires de base Guanine Cytosine pour 100 paires de base dans l'ADN, le coefficient de Chargaff (G+C%) des actinomycètes est supérieur à 55%, généralement compris entre 60% et 75% (Larpent et Sanglier 1989 ; Chun et al 1997). les espèces ne sont pas identifiées par cette technique.

Historiquement, la classification des bactéries était basée sur la similarité des caractères phénotypiques. Bien que cette méthode ait donné toute satisfaction, elle est coûteuse, lente et pas assez précise pour permettre la distinction entre les organismes les plus proches. L'étude des acides nucléiques a apporté des renseignements plus précis (Williams *et al*, 1989). Des auteurs insistent cependant, sur la nécessité de jumeler les études phénotypiques et moléculaires pour une identification encore plus précise (Goodfellow, 2004).

## 6. Classification des Actinomycètes

La taxonomie des actinomycètes a beaucoup évolué au cours des vingt à trente dernières années en même temps qu'évoluait le nombre de genres d'actinomycètes. En général, on peut subdiviser les Actinomycètes en 4 grandes familles :

### a) Les Mycobacteriacées

Elles renferment les Actinomycètes dont la morphologie est voisine de celle des bactéries. Les mycobacteriacées diffèrent de toutes les bactéries et autres Actinomycètes par leur acido-résistance grâce à la présence de substance cireuse présente dans leurs cellules. Cette famille est représentée par le seul genre *Mycobacterium* qui renferme plusieurs espèces pathogènes, dont la plus connue est *Mycobacterium tuberculosis*, agent de la tuberculose (Krasilnikov, 1958).



### **b) Les Actinomycétacées**

Cette famille est représentée par les genres *Nocardia* et *Actinomyces*. Le genre *Nocardia* comprend de nombreuses espèces très répandues dans le sol. Les colonies, difficiles à distinguer des colonies bactériennes, sont souvent confondues avec ces dernières lors des comptages. Le genre *Actinomyces* ne présente aucun intérêt en microbiologie du sol (Alexander, 1961).

### **c) Les Streptomycétacée**

Cette famille est caractérisée par une structure mycélienne permanente. La reproduction se fait par conidies. Le genre *Streptomyces* est très répandu dans le sol où il représente souvent 70 à 90 % des actinomycètes. Il se distingue des *Nocardia* par leur mycélium végétatif persistant quel que soit le stade de développement et une reproduction par des conidies en chaîne. Les colonies de *Streptomyces* comprennent un mycélium végétatif très serré, implanté dans le milieu et un mycélium aérien, plus lâche, d'aspect poudreux, formé d'hyphes terminés par des conidies en chaînes. Le genre *Micromonospora* est caractérisé par un développement faible ou nul du mycélium aérien; les conidies, isolées ou en grappes, sont portées directement par le mycélium végétatif. Les différentes espèces, pour la plupart thermophiles, se développent surtout dans les fumiers et les composts (Stanier, 1966)

### **a) Les Actinoplanacées :**

Les espèces appartenant à cette famille ont un cycle qui présente un stade mobile (sporangiospores mobiles). Cette famille est représentée par le genre *Actinoplanes* qui est aquatique. Le tableau 1 récapitule les différentes familles et genres d'Actinomycètes.



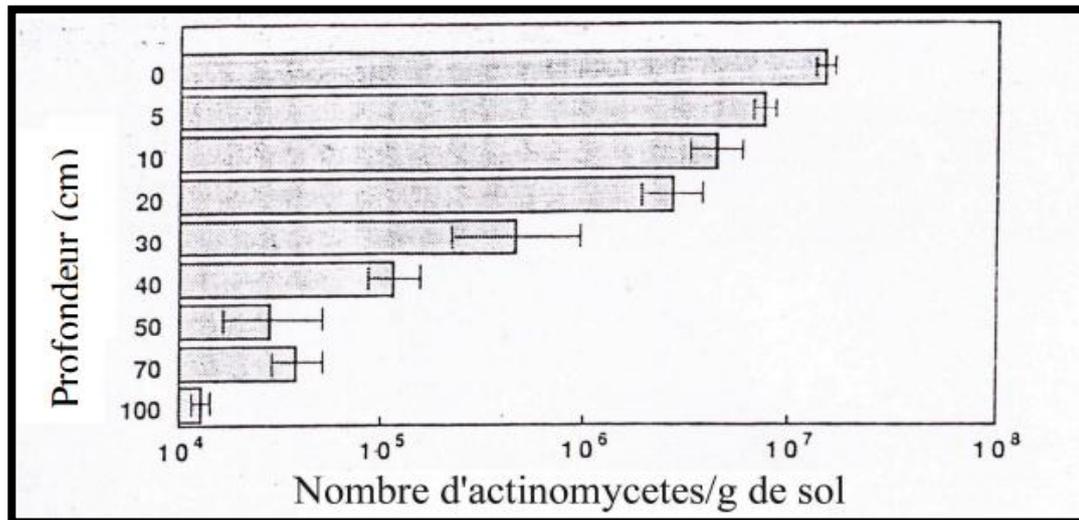
**Tableau 1: Les principaux genres d'Actinomycètes** (Krasilnikov, 1958).

Famille	Développement Mycélien	Mode de reproduction	Autre caractères	Genre
<b>Mycobacteriacees</b>	Transitoire limité	Scission binaire	-	<i>Mycobactérium</i>
<b>Actinomcetacees</b>	Extensif	Fragmentation massive des hyphes	Aérobie	<i>Nocardia</i>
	Extensif	Fragmentation massives des hyphes	Anaérobie	<i>Actinomyces</i>
<b>Streptomycetacees</b>	Extensif	Conidies	Conidies en chainettes	<i>Streptommyces</i>
	Extensif	Conidies	Conidies isolées ou en groupe	<i>Micromonospora</i>
<b>Actinoplanacees</b>	Extensif	Sporangispores mobiles	Formation de sporange	<i>Actinoplanes</i>

## 7. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont très largement distribués dans la nature. Elles colonisent une large variété d'habitats naturels, et sont capables de se développer sur une large gamme de substrats et principalement dans les sols de différentes natures. Ils ont été trouvés dans les eaux douces ou salées, dans les compostes, dans l'atmosphère et dans les substrats les plus divers.

Dans le sol, ils sont présents depuis la surface jusqu'à plus de 2 mètres de profondeur. Le nombre de ces microorganismes atteint d'après (Goodfellow et Williams, 1983), généralement les  $10^6$  germes par gramme de sol séché. D'après (Waksman, 1967), le rapport microorganisme totaux/Actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, alors que la couche superficielle contient au moins 80 % de bactéries actinomycétales, par rapport au nombre total de microorganismes, la couche située à une profondeur de 80 centimètre ne contient que (40%) ou beaucoup moins jusqu'à seulement 16 % (Waksman, 1967).



**Figure 3 : Distribution verticale des actinomycètes dans le sol (Iwai et Takashi 1992).**

Leur rôle dans le sol est important en raison de leur aptitude à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries (Crawford, 1993), et à produire des substances probiotiques et antibiotiques (Morel, 1996). Les premiers stades de la dégradation de la matière organique sont le fait de bactéries et de champignons. Les actinomycètes ne se développent pas durant ces premiers stades en raison de leur inaptitude à la compétition, par contre, ils se développent relativement bien sur une matière organique partiellement dégradée et inapte à porter une microflore fongique et bactérienne (Crawford, 1993).

Dans les eaux douces les actinomycètes isolés appartiennent le plus souvent aux genres *Micromonospora*, *Nocardia* et *Streptomyces*. Les actinomycètes intéressent les hydrobiologistes qui les suspectent d'être les agents responsables des égouts et des odeurs

Terreuses qui apparaissent parfois dans les eaux de contamination. De nombreux composés volatiles complexes ont été isolés et caractérisés. Les plus fréquemment cités sont la géosmine, la mucidone et la 2-méthyl-isobornéol. Ce dernier composé peut donner à l'eau des odeurs, même à une basse concentration (0,22 ppm) (Cross, 1981). Mais, le fait que ces composés soient produits directement dans l'eau par les actinomycètes est discutable. En effet, à partir des travaux effectués dans les réservoirs naturels d'eau. Cross a émis l'hypothèse que ces composés seraient produits dans les sols environnants, puis entraînés dans les réservoirs par les infiltrations et les eaux de ruissellement (Cross, 1981).



Les actinomycètes ont été également mentionnés dans les milieux marins (Woo et An 2002). Ils constituent une partie de la flore totale ; leur nombre est faible comparé à leur présence dans les eaux douces ou les sols. (Goodfellow et al 1983)

L'air constitue pour les actinomycètes, non pas un habitat mais un moyen de transport (Reponen et al 1990). Les spores de certains actinomycètes se développent dans des matériaux détériorés provoquant, lorsqu'elles sont inhalées, des maladies respiratoires. Les spores d'actinomycètes thermophiles sont produites en grande quantité et sont facilement mises en suspension dans l'air, lors de manipulations de matériaux détériorés et leur dissémination se fait facilement grâce au mouvement de l'air (Mazodier, 1974).

Certaines espèces d'actinomycètes semblent préférer certains habitats à d'autres. Par exemple les *Thermoactinomyces* et les *Faenia* se trouvent dans les composts, les foin en fermentation et les condenseurs de réfrigérateurs et de climatiseurs. Une majorité d'actinomycètes sont saprophytes, mais il existe des formes parasites et symbiotiques des plantes ou des animaux (Goodfellow et Williams, 1983).

## 8. Importance biotechnologique des actinomycètes

Les actinomycètes présentent de nombreux intérêts au niveau industriel, médical et environnemental. Leur importance et leur utilisation en biotechnologie relève du fait de leur capacité de synthétiser différents métabolites secondaires biologiquement actifs (Mincer et al, 2002).

On estime que les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés jusqu'ici sont produits par les Actinomycètes, et c'est Selman A. Waksman qui, le premier, a démontré la richesse des Actinomycètes dans ce domaine. Ce fut dans ses laboratoires que furent isolés quatre des premiers antibiotiques utiles : l'actinomycine, anti tumorale; la streptomycine, antibactérienne, y compris antituberculeuse ; la néomycine, antibactérienne ; et la candidicine, antifongique.

Parmi les espèces appartenant aux différents genres d'Actinomycètes, les *Streptomyces* sont les plus importants producteurs d'antibiotiques et autres métabolites secondaires. On peut estimer que 75 % des antibiotiques isolés des Actinomycètes sont produits par des *Streptomyces*. Il ne faut pas oublier que les antibiotiques ont trouvé une application en agriculture à des fins de lutte contre les maladies des animaux et des plantes et aussi pour



~~stimuler la croissance des animaux domestiques et accroître les rendements zootechniques (Tomita *et al.*,1990).~~

Sans oublier Les antagonistes microbiens qui sont largement utilisés en lutte biologique contre les champignons phytopathogènes. L'activité antagoniste de *Streptomyces* vis-à-vis des pathogènes fongiques est généralement liée à la production de composés antifongiques extracellulaires des enzymes hydrolytiques (Prapagdee *et al*, 2008).

En plus des antibiotiques antimicrobiens, les actinomycètes sont une source de substances antitumorales (actinomycine, adriamycine,), insecticides (mikkomycine), pesticides (antimycine A), herbicides (phosphinothricines) et de substances ayant des activités biologiques les plus diverses (immunosuppressives, immunostimulantes) (Dietera *et al*, 2003). Les enzymes sont, après les antibiotiques, les plus importants produits des Actinomycètes. Certaines sont utilisées à cet effet dans l'industrie alimentaire (isomérase du glucose) et dans celle des détergents (protéases). Les glycosidases des Actinomycètes jouent un rôle important dans la dégradation des biomasses végétales (amylases, xylanases) et animales (chitinases). Certaines de ces enzymes peuvent avoir des applications médicales (oxydases des stérols) et être utilisées en biologie moléculaire (endonucléases de restriction).

A côté de leur production d'antibiotiques, très importante, les actinomycètes possèdent d'autres propriétés intéressantes parmi elles: La production de phytohormones, des petites molécules régulatrices de la croissance végétale (Zahir *et al*, 1996) qui régissent la croissance et le développement en agissant sur la division, l'élongation et la différenciation cellulaires, La régulation de l'activité enzymatique et l'induction de la germination des racines (Archad et Frenkenberger, 1992). Les auxines sont un groupe qui a la capacité d'améliorer la croissance des plantes en stimulant l'élongation des cellules, l'initiation des racines, la germination des graines (El-Tarabily, 2008). L'acide indole acétique (AIA) est une auxine naturelle (Zahir *et al*, 1997). Environ 80% des bactéries de la rhizosphère peuvent sécréter de l'AIA (Bhavdish *et al*, 2003). Plusieurs espèces de *Streptomyces*, telles qu'*S. olivaceoviridis*, *S. rimosus*, et *S. rochei* de la rhizosphère de tomate, sont concernées (El-Tarabily, 2008). Aujourd'hui, certains actinomycètes de rhizosphère sont étudiés et mis au point un produit commercial (Mahadevan *et al*, 1997).



## II. PRODUCTION DES METABOLITES BIOACTIFS DES ACTINOMYCETES:

Une des propriétés la plus significative des Actinomycètes est leur aptitude à synthétiser de nombreux métabolites secondaires d'une diversité structurale très vaste et des milliers d'entre eux sont doués d'un potentiel d'activité biologique important (Higashide, 1984; Vining, 1992). C'est en 1940, après la découverte de l'actinomycine, que les Actinomycètes sont devenus l'objet de nombreuses recherches et ils ont été exploités durant les années 80, en conséquence, de nouvelles structures et surtout les antibiotiques sont continuellement isolés à partir des Actinomycètes. Ainsi, ces microorganismes sont devenus les premiers fournisseurs de ces métabolites, Les gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la résistance des antibiotiques sont regroupés en clusters dont l'expression est finement régulée.

### 1. Les antibiotiques

La synthèse des antibiotiques est largement répandue chez les Actinomycètes, 50 à 75% des souches isolées en sont productrices et sont à l'origine de 70% des antibiotiques naturels connus dans le monde (Okami, 1988). Les antibiotiques issus des Actinomycètes sont connus d'abord pour leurs applications médicales, ils présentent un intérêt significatif dans les domaines de la santé animale, de l'élevage et de l'agriculture (Berdy, 2005).

### 2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés selon leur spectre d'action (étroit ou large), type d'action (bactéricide ou bactériostatique), origine (élaboré par un organisme ou produit par synthèse), cible d'attaque (paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse

Des acides nucléiques) et la composition chimique (structure simple, structure complexes, peptides, polysaccharides, etc.).

Les antibiotiques des actinomycètes peuvent être classés selon leur composition chimique (Berdy, 2005).en:

- ✚ Les aminoglycosides (streptomycine, néomycine, kanamycine, gentamicine);
- ✚ Les macrolides (érythromycine);
- ✚ Les ansamycines (rifamycine);
- ✚ Les bêta-lactames (thiénamycine);



- ✚ Les peptides (viomycine, thiostrepton, actinomycine, pristinamycine);
- ✚ Les tétracyclines (chlortétracycline, oxytétracycline);
- ✚ Les nucléosides (puromycine);
- ✚ Les polyènes (nystatine, candicidine, amphotéricine B);

### 3. Régulation de la biosynthèse des antibiotiques

La production de métabolites secondaires est un processus influencée par plusieurs facteurs physico-chimiques, y compris l'alimentation en nutriments, l'oxygénation, la température et le pH. Ces facteurs ont été traditionnellement contrôlés et optimisé dans les fermentations industrielles afin d'améliorer la production de métabolites.

#### A. Influence des sources nutritionnelles

##### ➤ Effet de la source de carbone

Les sources de carbone lentement assimilées permettraient de meilleurs rendements de production d'antibiotiques comme les polysaccharides (amidon, dextrans) (Lebrihi et al., 1988, Lounès et al., 1995), les oligosaccharides (fructose, galactose, lactose) (Basak et al., 1973) ou les huiles (méthyloléate, huile de soja) (Park et al., 1994, Lounès et al. 1995), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol. L'origine d'une même source de carbone peut affecter la sécrétion des biomolécules par le microorganisme producteur. C'est le cas de l'antibiotique aminoglycoside, la néomycine.

Il a été démontré par (Adinarayana et al. 2003), que la production de cette molécule par la souche *Streptomyces marinensis* est fonction de l'origine céréalière de l'amidon utilisé comme source de carbone.

Chez beaucoup de microorganismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques produits par les actinomycètes (streptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (Demain, 1989; Piepersberg et al, 1997). Chez certains microorganismes, l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites est dû à l'acidification par suite de l'accumulation des acides organiques (Solé et al, 2000).



#### ➤ **Effet de la source d'azote**

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production (Lebrihi et al, 1992). Beaucoup d'antibiotiques possèdent un atome d'azote dans leur structure, en effet la source d'azote utilisée en culture microbienne est généralement l'ammonium ou des composés organiques comme les acides aminés. Le nitrate est aussi employé. Les sources plus favorables à la production de métabolites secondaires sont les acides aminés et les sources complexes d'azote qui supportent une croissance lente et une assimilation progressive de l'azote. D'autres auteurs ont montré que l'addition d'ammonium au milieu de culture augmente la production de certains métabolites secondaires tels que la streptomycine, la néomycine et la gentamicine (aminosides). Cet effet positif est dû à la conversion de l'ammonium en glutamine utilisée dans la formation des précurseurs (Gonzalez et al, 1995). Cependant, le choix de certains acides aminés comme source d'azote peut aussi entraîner une forte diminution de la production de métabolites secondaires surtout lorsqu'ils sont ajoutés en excès (Untrau et al, 1994 ; Lounès et al, 1995 ; Castro et al, 1985).

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 (Demain, 1982; Piret et al, 1998). En effet, dans de nombreux cas, la formation des précurseurs est inhibée par l'ammonium (Omura et al, 1984 ; Tanaka et al, 1986).

#### ➤ **Effet de la source de phosphate**

La production des métabolites secondaires est soumise à une régulation par le phosphate inorganique chez plusieurs espèces de bactéries (Liras et al, 1990;). Beaucoup de métabolites secondaires nécessitent pour leur formation des concentrations faibles en phosphate (inférieures à 10 mM). Toutefois des exceptions sont à noter: la thiopeptine (Miyairi et al, 1970) et la nocardicine (Aoki et al, 1976) où la synthèse réclame une concentration élevée en phosphate inorganique (100 à 200 mM).

La production d'antibiotique peut également être initiée par la carence en phosphate (Chmiel, 1986). Cependant, la cascade de régulations qui va de la détection d'une limitation en phosphate à l'induction de la voie de biosynthèse n'est pas encore élucidée.



➤ **Effet des Oligoéléments**

La synthèse de métabolites secondaires a une tolérance plus faible à la gamme de concentration en oligoéléments que la croissance. Plusieurs oligoéléments (Mn, Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo), cofacteurs de la croissance des microorganismes, sont nécessaires à des concentrations très faibles (environ  $10^{-7}$  M). Certains 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.

**B. Régulations par les paramètres environnementaux**

L'influence des facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires existe.

L'influence de la vitesse et du mode d'agitation et de l'aération sur la production de métabolites secondaires chez le genre *Streptosporangium*. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une agitation de type « turbine – hélice » marine. Il apparaît que la concentration en oxygène dissous est un paramètre important dans la production de métabolites secondaires. De plus, les auteurs de cette étude pensent qu'il serait possible de produire d'autres métabolites secondaires à partir de souches existantes uniquement par optimisation des conditions physicochimiques de la culture.

Concernant l'effet de la température, Doull et al, (1993) ont montré qu'un choc thermique d'une heure induit la production de jadomycine B chez *S. venezualae*.

La souche marine *Streptomyces* BT-408 possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40°C avec un optimum à 30°C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide SBR-22 est beaucoup plus étroite et varie entre 25 et 33°C (Sujatha et al, 2005).



### III. MATERIEL ET METHODES

#### 1. Echantillonnage du sol

Les échantillons de sol ont été collectés à partir de six sites de différentes régions du Maroc. Les échantillons de sol ont été prélevés dans des conditions d'asepsie rigoureuse. Pour chaque échantillon, 100g du sol ont été prélevés avec une spatule stérile à partir de 5cm de profondeur. Les échantillons ont été mis dans des sachets stériles et conservés à température ambiante jusqu'au laboratoire.

#### 2. Isolement des souches d'actinomycètes

Cette étape a pour but d'isoler et d'avoir le maximum d'isolat d'Actinomycètes contenues dans les échantillons de sol.

L'échantillon du sol est mis en suspension dans 100 ml d'eau physiologique stérile (à 0.9 % de NaCl pH neutre), puis agités pendant 15 min sous une énergie de sonication avec une fréquence de 100 kHz.

À partir de cette suspension, une série de dilution de  $10^{-1}$  à  $10^{-5}$  dans de l'eau physiologique stérile est préparée à partir de chaque échantillon. Après agitation au vortex pendant 10 min, les dilutions sont ensemencés dans le milieu CSA solide (Starch Casein Agar) milieu sélectif des actinomycètes (Wellington and Cross, 1983) (dont la composition chimique est la suivante : Amidon 10g/l.  $KNO_3$  2g/l.  $K_2HPO_4$  2g/l. NaCl 2 g/l. Caséine 0,3 g/l.  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  0,05 g/l.  $CaCO_3$  0,3 g/l.  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  0,01 g/l, agar-agar 18 g/l).

Les boites sont incubées à 30°C et sont observées quotidiennement pendant une semaine. Toutes les colonies présentes sur les boites après 7 jours sont purifiées dans des nouvelles boites. Cette dernière opération est répétée jusqu'à obtention de isolats purs.

#### 3. Identification macroscopique des isolats d'actinomycètes

L'identification des souches est effectuée avec une culture pure, l'étude des caractères cultureux permet d'observer macroscopiquement et de différencier les souches par :



Leur aspect, leur forme, leur taille, la couleur du mycélium végétatif et la couleur du mycélium aérien ainsi que d'autres caractères comme la production de pigment diffusible.

#### **4. Conservation des souches d'Actinomycètes**

Une colonie d'Actinomycète est prélevée à l'aide d'une anse d'inoculation stérile, puisensemencée sur 10 ml de milieu de culture CSA liquide. Les cultures sont ensuite incubées à une température de 30°C sous agitation permanente de 180 rpm. Après la semaine d'incubation, 800µl de la culture d'Actinomycète est introduit dans un eppendorf contenant 200µl de glycérol 100%. Les eppendorfs sont bien agités au vortex et immédiatement placés dans un congélateur -20°C.

#### **5. Extraction d'ADN génomique des isolats d'actinomycètes**

Les culots récupérés de la centrifugation sont additionnés de 15 ml de Tris (10 mM, EDTA ; 2 mM, NaCl ; 0.2 mM pH 8,0). Pour la lyse de la paroi cellulaire 1,5 ml de SDS (20 % w/v) sont ajoutés et le mélange est incubé pendant 20 min à 55°C avec agitation occasionnelles toutes les 5 minutes. Le contenu est centrifugé pendant 10 min à 8000 rpm pour éliminer les débris cellulaires. Par la suite le surnageant est récupéré et incubé dans la glace pendant 30 min. Après l'incubation un volume d'isopropanol a été ajouté afin de précipiter l'ADN. Le mélange est centrifugé pendant 20 min à 8000 rpm à 4°C, le surnageant est jeté et les culots sont séchés à l'étuve à 37°C. 500 µl de l'eau bidistillée sont ajoutés pour solubiliser les acides nucléiques. Le mélange est encore centrifugé.

#### **6. Amplification de l'ADNr 16S par PCR**

Il s'agit d'une amplification spécifique d'un fragment d'ADN de la sous unité ribosomique 16S, effectuée *in vitro* par extension itérative de deux amorces :

Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3');

Rp2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3').

Le mélange réactionnel (50 µl) contient 50 ng d'ADN génomique, 1.2 mM de MgCl<sub>2</sub>. 5 µl du tampon Taq (10 ×), 0.5 µM des dNTPs, 1,25 µl de chaque amorce (10 µM) et 0,2U

De la Taq polymérase.



La réaction d'amplification par PCR est réalisée dans un appareil (thermocycleur) permettant de programmer les durées et les températures des trois étapes d'un cycle ainsi que le nombre de cycles désirés : L'opération débute par une dénaturation à 94°C pendant 5 min, suivie par 30 cycles pendant 45s d'hybridation à 55°C et d'élongation à 72 °C pendant 1.5 min.

### **7. Analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose**

L'électrophorèse sur gel est une méthode utilisée de façon standard pour séparer, identifier et purifier des fragments d'ADN. Une solution d'agarose à 1 % est préparée dans du TAE 0,5X (tampon de migration), chauffée jusqu'à dissolution complète puis refroidie à la température ambiante. Le bromure d'éthidium est ajouté à une concentration de 0.2 µg/ml.

Le gel est coulé sur un plateau de gel muni d'un peigne. Après polymérisation, le gel est placé dans une cuve d'électrophorèse dans le tampon TAE 0,5X. La préparation d'ADN (5 µl) est mélangée avec 2 µl d'une solution de charge avant de le déposer dans les puits du gel afin de suivre sa migration. La solution de charge contient essentiellement un marqueur de mobilité, bleu de bromophenol qui permet de suivre la migration et un alourdisseur (glycérol) pour entraîner l'ADN au fond des puits. La migration est réalisée au moyen d'un générateur de courant sous un voltage de 100 volts. La visualisation de l'ADN sur le gel d'agarose est réalisée grâce à un transilluminateur UV pour électrophorèse (VWR-Genosmart).

### **8. Analyse RFLP Polymorphisme de longueur de fragments de restriction (Restriction Fragment Length Polymorphism)**

Le principe consiste à obtenir plusieurs fragments d'ADN de différentes tailles résultats de l'action d'une ou plusieurs enzymes de restriction à partir d'un fragment d'ADN initial. Pour déterminer le profil de restriction, on procède à une électrophorèse sur gel ce qui permet leur séparation en fonction de leur taille. On trouve alors des fragments de tailles différentes chez des *individus* distincts. La variabilité d'un site de restriction se traduit par un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. Le mélange réactionnel d'analyse RFLP du fragment obtenu par PCR, contient 10 µl de produit de PCR, 2 µl de tampon 10X ; c'est un tampon à concentration moyenne de sel convenable ou l'enzyme de restriction utilisé Alu I avec un volume 0,5 µl et 7,5 µl d'EDS. L'enzyme de restriction utilisé coupe au niveau du site 5'---AGCT---3', Le mélange réactionnel est incubé pendant une heure à 37 °C.

Le profil a été déterminé par électrophorèse sur gel d'Agarose 1% ce qui permet leur séparation en fonction de leur taille.



## 9. Test d'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes

L'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes est évaluée sur des souches indicatrices par la méthode de diffusion sur gélose.

La technique de la gélose molle est une méthode de diffusion sur gélose permettant de repérer les souches qui sont actives sur les souches indicatrices et d'évaluer la sensibilité de ces souches. La diffusion de l'extrait actif des isolats dans le milieu peut inhiber la croissance des souches à tester, une zone claire ou zone d'inhibition autour de la bactérie productrice de l'agent antibactérien est observée.

L'activité des isolats d'actinomycètes est testée sur 4 souches bactériennes disponibles au Laboratoire de Biotechnologie d'Université Al Akhawayen. (Tableau 5)

**Tableau 2: Caractéristiques des souches à indicatrices**

Les souches indicatrices	Pathogénicité
<i>Escherichia coli</i> Adn01	infections urinaires,
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC	intoxication alimentaire
<i>Erwinia chrysanthemi</i> IIIV	phytopathogène provoque la maladie de la pourriture molle
<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méthiciline	responsable d'intoxications alimentaires, d'infections localisées suppurées et, dans certains cas extrêmes, de septicémies physiques (greffe, prothèses cardiaques).

### A. Préparation de l'inoculum.

Une ou deux colonies bactériennes cibles sont prélevées à l'aide d'une anse stérile et inoculées dans 10 ml du milieu LB (10 g/l de tryptone 5 g/l d'extrait de levures 10 g/l de NaCl 15g/l d'Agar pH 7,2), après 18 h de culture à 37°C la turbidité de l'ensemble est mesurée à l'aide d'un spectrophotomètre de manière à obtenir une densité optique égale à 1,5 (DO= 1,5) à la longueur d'onde à 600 nm qui correspond à  $5.10^8$  UFC/ml.

La surface entière du milieu CSA solide préalablementensemencé par les isolats d'actinomycètes sous forme de spot de diamètre de  $\approx 0.3$  cm, incubés pendant 4 à 5 jours à



30°C et 37°C, est inondée par 5 ml de l'agar molle milieu MH (Mueller-Hinton) contenant 4g/l agar agar inoculé par chaque germe cible (densité finale de  $10^4$  UFC/ml).

Les zones d'inhibitions sont mesurées à l'aide d'une règle graduée millimétrée après incubation à 37°C et 30°C pendant 24 à 48 heures.

## 10. Cinétique de production des molécules bioactives

Le suivi de la cinétique de production des substances bioactives par quatre isolats d'actinomycètes est réalisé en utilisant le milieu CSA solide.

Les cinq isolats sont ensemencés sous forme de spot de diamètre de  $\approx 0.3$  cm successivement après chaque 24 h pendant 4 jours sur des boîtes contenant le milieu CSA solide. Les boîtes sont incubées à 30°C et 37°C. Le test d'activité antimicrobienne par la méthode de diffusion en gélose est effectué lors du 4<sup>ème</sup> jour.

## 11. Effet de la source de l'azote inorganique sur la production des molécules antibactériennes :

L'activité antimicrobienne des différents isolats d'actinomycètes est mise en évidence par la méthode de diffusion sur gélose, en utilisant 3 milieux de culture avec les mêmes conditions de tampon, même composition minérale et même source de carbone et sont différents par la source d'azote minérale. La composition chimique est la suivante

- **BL1** (Agar 15g/l ; Amidon 10g/l ; caséine 0,3g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  13,6 g/l ;  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  2g /l ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/l NaCl 5g/l. pH 7,2).
- **BL2** (Agar 15g/l ; Amidon 10g/l ; caséine 0,3g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  64g/l ;  $\text{NH}_4\text{Cl}$  25g /l ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  10g/l NaCl 25g/l. pH 7,2).
- **BL3** (Agar 15g/l ; Amidon 10g/l ; caséine 0,3g/l ;  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  12,8g/l ;  $\text{KNO}_3$  2g /l ;  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  2g/l NaCl 5g/l. pH 7,2).

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés sous forme de spot de diamètre de  $\approx 0.3$  cm sur des boîtes contenant les milieux suivants. Après 5 jours d'incubation à 37°C, le test d'activité antibactérien est effectué par la méthode de diffusion comme déjà décrit. Les zones d'inhibitions sont mesurées à l'aide d'une règle graduée millimétrée après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.



## 12. Production et préparation d'extraits riches en métabolites

### secondaires :

Cette étape a pour but de préparer des extraits à partir du milieu de croissance des espèces purifiées d'actinomycètes isolées.

A partir de la culture pure d'Actinomycète, une colonie est ensemencée dans 10 ml de milieu de culture CSA liquide. Les cultures sont ensuite incubées pendant 7 jours à 30°C sous agitation constante de 180 rpm. Cet inoculum est utilisé pour inoculer un volume de 100 ml de milieu de culture CSA. Après 7 jours d'incubation, les cultures sont centrifugées et filtrées à travers un filtre de 0,22 µm. Les filtrats obtenus pour chaque isolat sont concentrés par évaporation sous vide à -55°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Les résidus secs sont ensuite repris dans 1 ml de méthanol, puis centrifugés pendant 5 min à 8000 rpm. L'extrait est préparé avec une concentration de 50 mg/ml.

L'activité antimicrobienne est évaluée en déposant 20 µl de l'extrait organique dans les puits sur des boîtes contenant le milieu LB on laisse sécher pendant 20 min. Après, 5 ml de la gélose molle inoculées par les souches tests (*E. coli* Adn1, *B. subtilis* ATCC et *St. aureus* méthiciline résistante) sont coulées sur les boîtes. Les zones d'inhibitions sont mesurées à l'aide d'une règle graduée millimétrée après incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures.

## 13. L'effet de la concentration en amidon sur la production du métabolite secondaire à effet antibactérienne.

Pour avoir l'influence de la source de carbone sur la production des métabolites, différentes concentrations d'amidon (0g/l. 1g/l. 2g/l. 3g/l. 5g/l. 8g/l. 10g/l) sont utilisées dans le milieu CSA. La bactérie est par la suite ajoutée et incubée à 37°C sous agitation constante de 180 rpm pendant 8 jours. Des échantillons de différentes cultures sont récupérés après chaque 24 h et un extrait est préparé pour des analyses qualitatives. Les cultures sont ensuite centrifugées à 8000 rpm pendant 10 min afin d'éliminer la masse mycélium. Après séparation, le surnageant obtenu est procédé comme décrit avant.

## 14. Chromatographie liquide

L'extrait préparé auparavant (2 g), est séparé sur une colonne contenant le support gel de silice C-18. La phase mobile est un mélange entre une solution de et l'acétonitrile-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>



---

(70%-0.1%) dans lequel l'acétonitrile change comme suit: 200 ml, 10 %; 600 ml, 50% ; 1000ml, 70%; le débit est maintenu à 2 ml / min. les différentes fractions collectées sont testées par CCM (Chromatographie sur couche mince). Les fractions identiques sont rassemblées et testées pour leurs activités antimicrobiennes.

## 15. Chromatographie sur couche mince

Une chromatographie sur couche mince est réalisée sur plaque (CCM) pour analyser les différents extraits. Différentes phases mobiles sont utilisées comme phase mobile.

On dépose sur la phase fixe une petite quantité de chaque extrait à séparer et on met cette phase au contact de la phase mobile contenant chloroforme 40% et acétate d'éthyle 60% et l'acide acétique 1%. La détection a été réalisée sous UV 254 et 335 nm ou par pulvérisation d'une solution de 10% H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>.



## IV. RESULTATS

### 1. Isolement des souches d'actinomycètes:

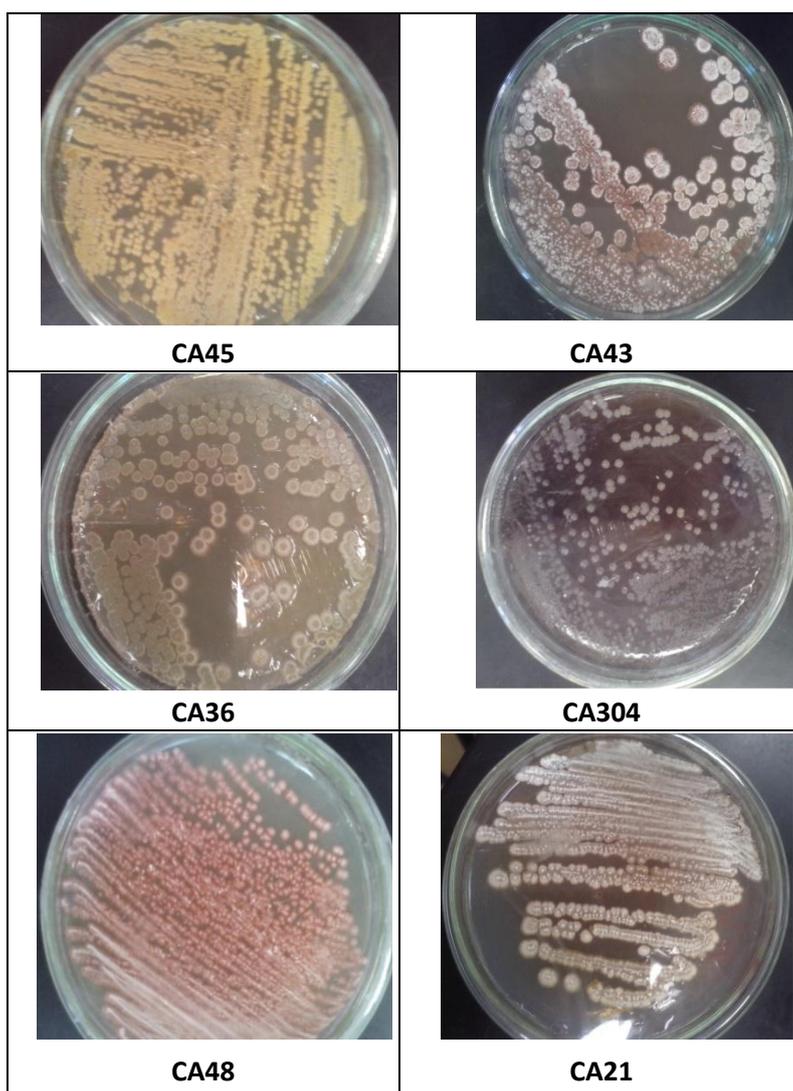
29 souches d'Actinomycètes isolées sur le milieu CSA sont morphologiquement similaires avec des colonies de formes arrondies, à bords irréguliers et incrustées dans le milieu de culture. Mais ce qui différencie les souches c'est la couleur du mycélium aérien, celle du mycélium végétatif, leurs tailles et la production de pigments. Les caractéristiques morphologiques des colonies suggèrent qu'il s'agit bien de souches actinomycétales ; en effet les colonies apparaissent rugueuses, rondes à contours irréguliers, avec un aspect crayeux ou non, colorées ou non. Certains isolats sécrètent des pigments. Les caractéristiques de chaque souche d'Actinomycètes sont présentées par le tableau 3 qui résume les différents caractères morphologiques des souches d'Actinomycètes isolées

**Tableau 3 : Répartition des isolats selon le site et Caractères morphologiques des souches d'Actinomycètes**

code de la souche	Site d'isolement	Taille des colonies	Couleur du mycélium aérien	Couleur du mycélium de substrat	Pigmentation	
CA11	Site 1	Moyenne	Blanche	Blanche	—	
CA13		Petite	Blanche	Jaune	—	
CA14		Moyenne	Jaune	Marron	Marron	
CA15		Petite	Blanche	Blanche	—	
CA18		petite	Blanche	Incolore	—	
CA18'		petite	Jaune	Jaune	—	
CA21	Site 2	Grande	Blanche	Blanche	—	
CA33	Site 3	Petite	Jaune	Jaune	—	
CA34		Moyenne	Blanche	Blanche	—	
CA35		Petite	Incolore	Incolore	—	
CA36		Moyenne	Blanche	Incolore	—	
CA37		Moyenne	Blanche	Jaune	—	
CA38		Moyenne	Blanche	Incolore	—	
CA39		Grande	Blanche	Incoloré	—	
CA41		Site 4	Petite	Incoloré	Incoloré	—
CA42			Grande	Blanche	Grise	—
CA43	Moyenne		Jaune	Blanche	—	
CA44	Moyenne		Blanche	Rose	—	
CA45	Petite		Blanche	Incoloré	—	
CA46	Moyenne		Incolore	Incoloré	—	
CA47	Grande		Blanche	Blanche	—	
CA48	Petite		Blanche	Rouge	—	



—CA49		Petite	Rose	Blanche	—
CA49'		Moyenne	Rouge	Rouge	Rouge
CA208	Site 20	Grande	Blanche	Grise	Grise
CA301	Site 30	Moyenne	Jaune	Jaune	—
CA302		Grande	Biège	Marron	Marron
CA303		Grande	Blanche	Incoloré	—
CA304		Petite	Marron	Marron	Marron



**Figure 4: exemples d'isolats d'Actinomycètes sur milieu CSA**



## 2. PCR des fragments d'ADN 16S des isolats d'actinomycètes et électrophorèse sur gel d'agarose

La figure 6 montre les résultats de la PCR des fragments de l'ADN 16S, amplifiés avec les amorces ribosomal. Fd1 (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') ; Rp2 (5'-AAGGAGGTGATCCAGCC-3').

Les fragments d'ADNr 16S amplifiés à partir des 10 isolats d'actinomycètes ( CA37, CA49', CA302, CA304', CA304, CA48, CA44, CA46, CA36, CA49) par la PCR donne un seul produit d'amplification, une bande d'environ 1400 pb, par comparaison avec le marqueur de taille utilisé le 1 kb plus DNA ladder (Invitrogen®).

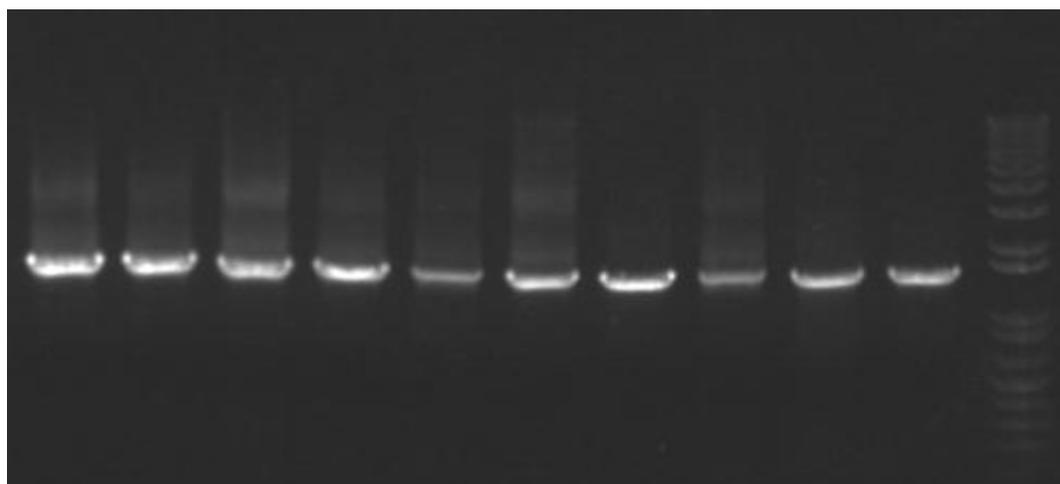


Figure5: électrophorèse sur gel d'agarose des produits PCR des isolats d'actinomycètes

## 3. Analyse RFLP des isolats d'actinomycètes par électrophorèse sur gel d'agarose

Afin de souligner les divergences au niveau des fragments d'ADNr 16S amplifiée à partir des isolats, l'utilisation d'enzyme de restriction Alu I générant des coupures à un site précis 5'---AG CT---3' s'avère être un moyen simple et rapide pour caractériser et comparer des espèces apparentées. A partir des profils de restriction on a pu regrouper

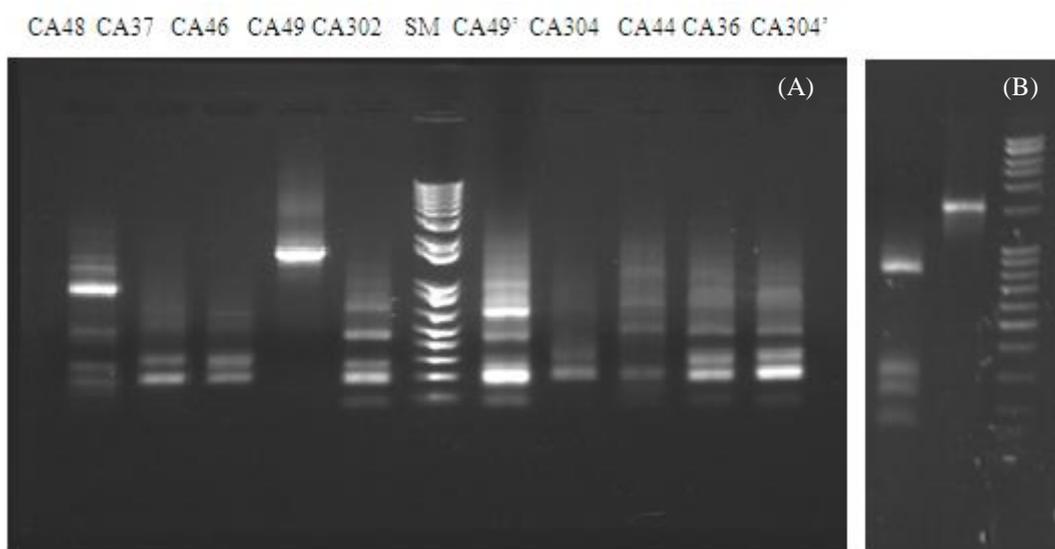
Parmi la panoplie de bandes obtenues (figure 5) et par comparaison avec le marqueur de taille utilisé (1kb Plus DNA Ladder, Invitrogen) on constate que :

Les deux isolats CA46 et CA37 ayant les mêmes bandes de même tailles (205.88 pb 447.21pb 533pb.), respectivement.

Les deux isolats CA304' et CA36 ayant les mêmes bandes de mêmes tailles (426.33pb et 660.68), respectivement.

Les autres isolats (CA302 CA49' CA48, CA304, CA44) montre différentes bandes correspondes aux différentes coupures alors que l'isolat CA49 n'avait pas de site de restriction 5'---AG CT---3'dans la partie d'ADNr 16s amplifié des actinomycètes.

L'annexe 1 montre les caractéristiques des profils RFLP obtenus à partir des fragments d'ADN 16S des différents isolats.



**Figure 6: (A) : électrophorèse sur gel d'agarose montrant les profils RFLP des différents fragments d'ADN 16S, (B) : RFLP du fragment d'ADN 16S de l'isolat CA49 par EcoR1 et BglII**

#### **4. PRODUCTION ET EXTRACTION DE METABOLITES SECONDAIRES :**

##### **A. Criblage de l'activité antibactérienne à différentes températures.**

L'activité antimicrobienne a été mise en évidence par la technique de la gélose molle une méthode de diffusion sur gélose sur milieu CSA solide qui permet de détecter l'effet inhibiteur des souches d'actinomycètes envers les microorganismes testés utilisés.



La croissance d'un germe test permet, après incubation, de déceler la présence de substances inhibitrices par l'apparition d'une zone claire au niveau de la zone de diffusion de l'antibiotique, alors que partout ailleurs, le développement du micro-organisme est visible.

**Tableau4 : Résultats de l'activité antibactérienne des souches isolés d'actinomycètes sur 1 es 4 souches testés. Les valeurs numériser le tableau montrent les diamètres d'inhibition en (mm).**

N°de l'isolat	B. subtilis		E. chrysanthemi		S. aureus		E. coli	
	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C	30°C	37°C
11	8	-		-	7	-	-	-
13	7	-	-	4	12	7	-	-
14	-	10	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-
21	-	13	-	-	-	8	-	14
33	-	-	-	-	-	-	-	-
34	12	7	1	5	10	-	11	-
35	-	-	-	-	-	-	-	-
36	6	-	7	4	4	-	5	-
37	5	-	4	-	-	-	-	-
38	-	-	5	-	4	-	-	-
39	-	-	-	-	-	-	-	-
41	12	-	-	3	-	-	14	10
42	14	13	-	-	11	5	11	6
43	-	-	-	-	-	-	-	-
44	-	-	-	-	-	-	-	-
45	-	10	10	12	-	-	10	13
46	-	8	-	-	-	-	10	8
47	-	-	-	-	-	-	-	-
48	-	17	-	10	12	4	17	17
49	-	18	-	-	8	-	10	11
49'	-	5	7	-	5	9	10	12
208	-	-	-	-	5	8	-	-
301	-	-	-	-	-	-	-	-
302	-	-	-	-	-	-	-	-
303	-	-	-	-	-	-	-	-
304	-	8	5	9	7	9	-	-

D'après les résultats obtenus on constate que parmi 27 isolats d'actinomycètes;17 souches(CA11,CA13,CA14,CA34,CA36,CA37,CA38,CA41,CA42,CA49',CA46,CA45,

CA48, CA49, CA21, CA208, CA304) sont douées d'activité antibactérienne au moins sur une souche teste parmi les 4 souches testés.

D'après les résultats, nous avons constaté que les bactéries à Gram positif tels que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont plus sensibles aux isolats d'Actinomycètes a activité antibactérienne que les bactéries à Gram négatif *Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi*

On remarque que 18 isolats présentent une activité avec des diamètres d'halot d'inhibition plus importants à 30°C que les 9 isolats d'actinomycètes qui ont montrés une activité antibactérienne à une température d'incubation de 37°C.

Par contre 10 isolats d'actinomycètes n'ont pas montré d'activité sur tous les microorganismes testés.

Les zones d'inhibition provoquées par les isolats actives sur les germes testés sont présentées sur la figure 7.

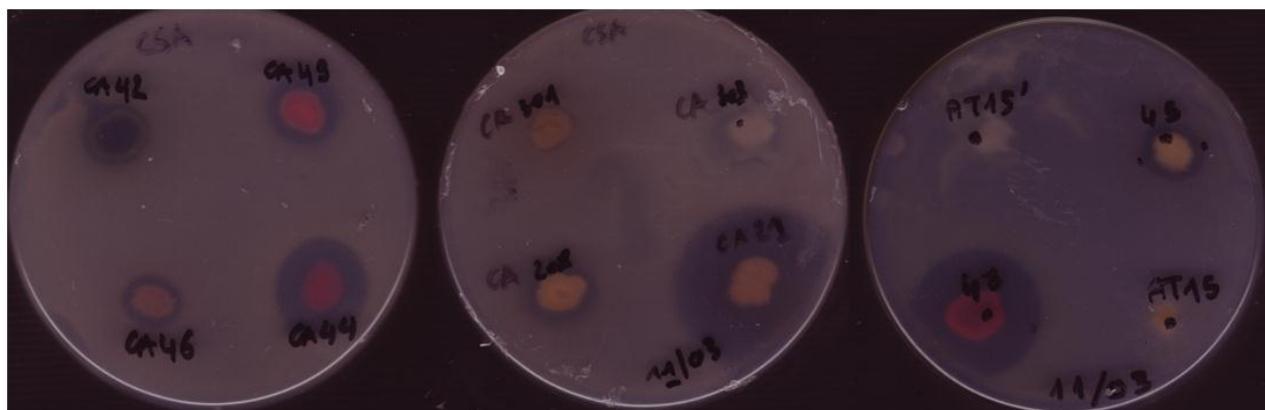


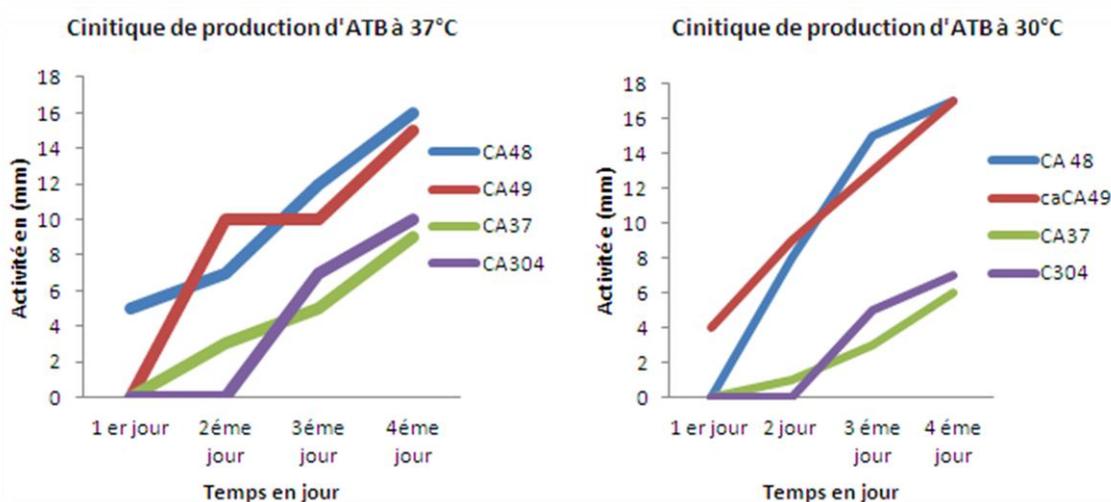
Figure 7: exemples des zones d'inhibition provoquées par certains isolats actives sur les germes testés

### B. Cinétique de production d'antibiotique

La cinétique de production des substances bioactives a été étudiée sur le milieu solide CSA pour les souches d'actinomycètes CA37 ; CA48; CA302; CA49. Les résultats obtenus sont montrés dans figure 8.

On constate que les activités antibactériennes n'apparaissent qu'après deux jours d'incubation, à l'exception des isolats CA48 à 37°C et l'isolat CA49 à 30°C et qui ont

Montrés une activité antibactérienne contre le microorganisme testé dès le 1<sup>er</sup> jour d'incubation. Les activités antibactériennes augmentent progressivement pour atteindre leurs maxima au 4<sup>ème</sup> jour où on a remarqué les plus grandes valeurs des auréoles d'inhibition pour les 4 souches tests



**Figure 8 : Cinétique de production d'antibiotique des 4 isolats d'actinomycètes à 30°C et à 37°C**

### C. Effet de la source d'azote inorganique sur la production des antibactériens.

#### Tableau 5: Activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes en fonction des milieux de production

L'activité antimicrobienne des différents isolats d'actinomycètes est mise en évidence par la méthode de diffusion sur gélose sur 3 milieux tamponnés différents BL1, BL2 et BL3, qui contiennent la même source de carbone, l'amidon, avec différentes concentrations. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau 5.

Les 7 isolats CA34, CA37, CA44, CA45, CA48, CA49', CA304 montrent une activité antibactérienne contre *B. subtilis* sur les 3 milieux BL1, BL2 et BL3. Les isolats CA45, CA49', CA304 n'ont montré aucune activité antimicrobienne contre le microorganisme testé sur le milieu BL2.



	Milieu BL1		Milieu BL2		Milieu BL3	
	+	Ø d'inhibition en (mm)	+	Ø d'inhibition en (mm)	+	Ø d'inhibition en (mm)
CA11	-		-		-	
CA13	-		-		-	
CA14	-		-		-	
CA15	-		-		-	
CA18	-		-		-	
CA18'	-		-		-	
CA18''	-		-		-	
CA21	-		-		-	
CA33	-		-		-	
CA34	+	5 mm	+	4 mm	+	7 mm
CA36	-		-		-	
CA37	+	12mm	+	7mm	+	16mm
CA38	-		-		-	
CA39	-		-		-	
CA41	-		-		-	
CA42	-		-		-	
CA43	-		-		-	
CA44	+	6mm	+	6mm	+	11mm
CA45	+	5mm	-		+	7mm
CA46	-		-		-	
CA47	-		-		-	
CA48	+	6mm	+	9mm	+	12mm
CA49	+	8mm	+	6mm	+	11mm
CA49'	+	5mm	-		+	6mm
CA301	-		-		-	
CA302	-		-		-	
CA303	-		-		-	
CA304	+	4mm	-		+	5mm

L'ensemble des diamètres des zones d'inhibition obtenus à partir du milieu BL3 sont les plus importants par rapport aux autres des milieux BL1 et BL2 (figure 9).

On peut constater que la source d'azote fournit par le milieu BL3, qui est le nitrate de potassium  $KNO_3$ , s'avère la meilleure source d'azote pour la production de l'activité antibactérienne diffusible. Tandis que la source d'azote utilisé par le milieu BL1 et BL2 est l'ammonium, sous forme de sulfate d'ammonium, dans le milieu BL1 et sous forme de chlorure d'ammonium ( $NH_4Cl$ ), dans le milieu BL2.

La concentration d'ammonium fournit par le milieu BL2 (25g/l de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ) est très plus important par rapport à celle fournit par le milieu BL1 (2g/l de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ), dans lequel on a obtenu plus de résultats positifs par rapport au milieu BL2 (figure 9). L'isolat CA37 montre une activité antagoniste sur les trois milieux.

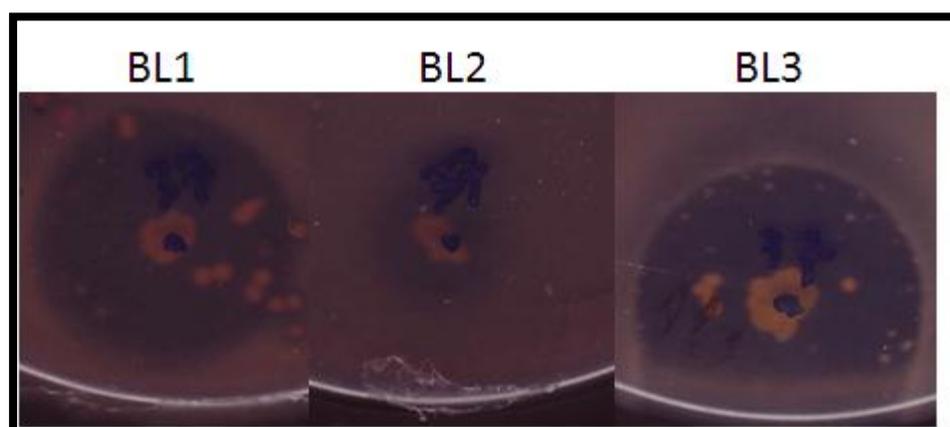


Figure 9 : effet de la source d'azote inorganique sur l'activité de l'isolat CA37 sur *B. subtilis*

## 5. Activité antibactérien des extraits des isolats d'actinomycètes

Certains extraits semblent être plus actifs que d'autres, comme le cas de l'extrait CA304 sur et *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec un diamètre de zone d'inhibition de 12mm et 6 mm respectivement, l'extrait CA49' sur *Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus* avec le même diamètre de zone d'inhibition (6 mm), l'extrait CA302 sur *Bacillus subtilis* (12 mm), l'extrait CA 42, CA 46 et CA18 sur *Bacillus subtilis* (7 mm), et l'extrait CA37 sur *Staphylococcus aureus* (10 mm).

Les résultats obtenus ont aussi montrés une action et un degré de sensibilité variables des germes vis-à-vis de ces extraits. Cette différence de sensibilité des micro-organismes vis-à-vis des extraits d'Actinomycètes pourrait être en rapport avec la composition de ces derniers qui varie selon la souche productrice. D'après les résultats, nous avons constaté que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux extraits d'Actinomycètes.



**Tableau 6: Diamètre d'inhibition (mm) des extraits sur les souches testées**

Extraits des souches	Effet Contre B. subtilis		Effet contre S.aureus	
	-/+	Ø d'inhibition en mm	-/+	Ø d'inhibition en mm
CA11	-		-	
CA13	-		-	
CA14	-		-	
CA15	-		+	4
CA18	+	7	+	3
CA33	-		-	
CA34	-		-	
CA36	-		+	5
CA37	+	5	++	10
CA38	+	4	-	
CA41	-		+	5
CA42	+	7	+	5
CA43	-		-	
CA44	-		-	
CA45	-		-	
CA46	+	7	+	4
CA47	+	7	-	
CA48	+	5	-	
CA49	-		-	
CA49'	+	6	+	6
CA21	-		-	
CA208	-		-	
CA301	-		-	
CA302	++	12	+	
CA303	-		-	
CA304	++	12	+	6

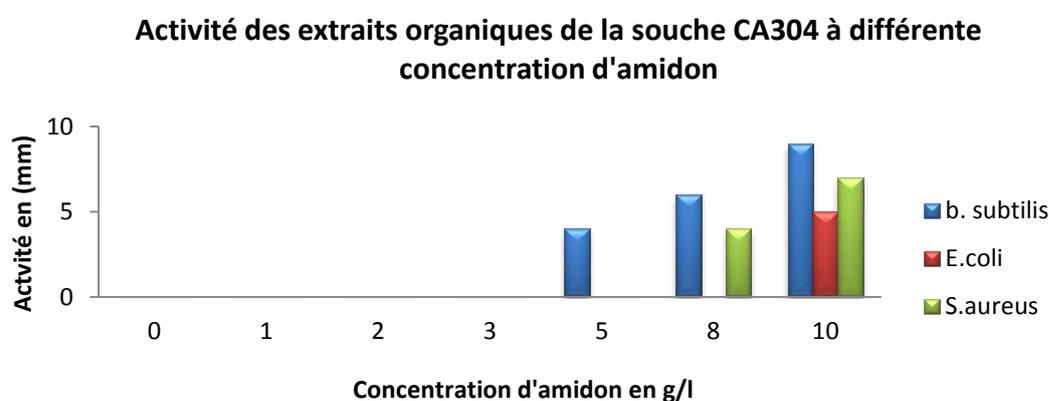
#### **6. Activité antibactériens des extraits de l'isolat CA304 sur milieu CSA à différentes concentrations d'amidon**

Afin d'évaluer l'influence de la concentration de source de carbone sur les métabolites antimicrobiennes produites par l'isolat CA304, cette dernière est ensemencé sur 100 ml de milieu CSA liquide, à différentes concentration d'amidon. L'effet des extraits est obtenus sur les trois micro-organismes testés *B. subtilis*, *S. aureus*, *E. Coli* (figure 11).



Pour les 4 premières concentrations d'amidon 0g/l, 1g/l, 2g/l, et 3g/l, aucune activité n'est obtenue pour les 3 souches testées. A partir de 5g/l d'amidon, l'extrait obtenu avec l'isolat CA304 montre une activité positive contre la souche teste *B. subtilis*. Cette activité augmente progressivement avec l'augmentation de la concentration d'amidon.

L'effet antagoniste des extraits de l'isolat CA304 vis à vis de la souche testé *S.aureus* n'est obtenu qu'avec une concentration de 8g/l d'amidon (auréole d'inhibition de 4mm) pour

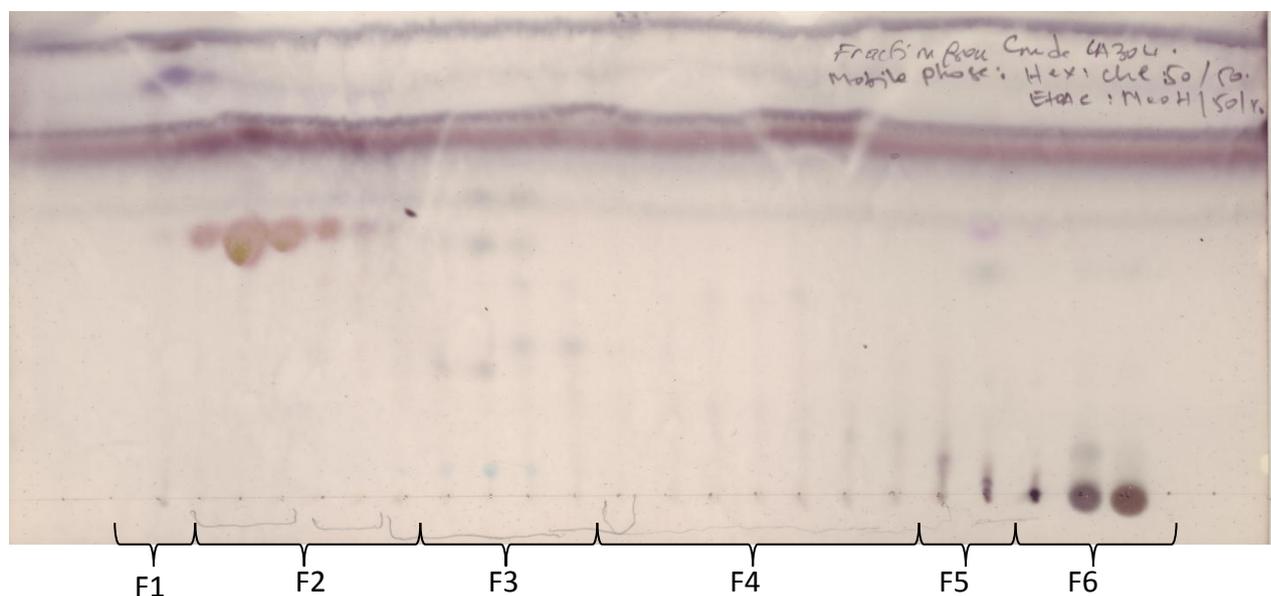


**Figure 10: Activité des extraits métaboliques de l'isolat CA304**

D'après les résultats, nous avons constaté que les bactéries à Gram positif sont plus sensibles aux extraits actifs d'Actinomycètes produites par ces micro-organismes, même à des faibles concentrations de source de carbone (Figure 10).

#### **D. Fractionnement et criblage de l'extrait pour l'activité antibactérienne**

L'extrait préparé à partir d'une culture 100ml contenant l'isolat CA304 dans le milieu CSA liquide a été séparé pour ces constituants en fonction de leur polarité sur un support du gel de silice C-18. La figure 11 montre le profil de CCM des différentes fractions obtenues. Les fractions du même profil ont été rassemblées, concentrées et finalement préparées à une concentration finale pour les tests de l'activité antibactérienne. Les résultats de ce test ont montrés que la fraction F2 semble active contre *B. subtilis* et *S. aureus* avec une CMI de 14.3 µg/ml et 35.2 µg/ml.



**Figure 11 : CCM des différentes fractions collectées durant la chromatographie liquide**



## V. DISCUSSION

Les Actinomycètes sont des microorganismes faciles à cultiver. Par ailleurs, leur croissance lente et leur faible nombre dans les échantillons de sol sont souvent masqués par les bactéries et les champignons à croissance rapide lors de l'isolement. Par conséquent, l'utilisation des milieux spécifiques ou additionnés d'antibiotiques combinés à des traitements des échantillons de sol facilite l'isolement de ces groupes de microorganismes. (Shearer, 1997).

Un total de 29 isolats d'actinomycètes est obtenu à partir du sol. Seulement le milieu de culture CSA (Caséine Amidon Agar) a été utilisé. Ce milieu est décrit dans la bibliographie (Wellington and Cross, 1983) comme étant un milieu sélectif approprié pour l'isolement de ces bactéries. En effet, il contient certaines sources de carbone et d'azote comme l'amidon, la caséine, le nitrate de potassium, les éléments minéraux, l'hydrogénophosphate de potassium, NaCl et le carbonate de calcium le rend moins favorable à la croissance des bactéries autres que les actinomycétales (Pisano et al, 1986). Par conséquent, le nombre des bactéries trouvé communément dans les échantillons de sol est fortement réduit. Les colonies apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 30°C. Les caractéristiques morphologiques des colonies suggèrent qu'il s'agit bien de souches actinomycétales. En effet les colonies apparaissent rugueuses, rondes à contours irréguliers, avec un aspect crayeux ou non, colorées ou non. Certains isolats sécrètent des pigments.

L'identification des Actinomycètes par des méthodes phénotypiques classiques est notoirement difficile et peu fiable. Ces méthodes s'avèrent plus intéressantes pour la caractérisation des isolats. L'identification moléculaire a été mise en place à partir des années 80, et consiste à l'application des méthodes d'analyses génétiques et moléculaires, notamment la détermination du pourcentage en GC, l'hybridation ADN-ADN (Labeda et al 1992) et le séquençage de l'ADN ribosomique 16S (Jeffrey, et al 2008). Ces techniques ont permis de tracer toute la phylogénie des bactéries notamment.

Dans nos résultats, un seul produit d'amplification, une bande d'environ 1400 pb, est obtenu dans les essais de PCR pour les 10 isolats d'actinomycètes étudiés (CA36, CA37, CA44, CA46, CA48, CA49, CA49', CA304, CA304' et CA302).



L'analyse par RFLP révèle plus d'informations différentes que les polymorphismes de longueur du produit PCR seul. La variabilité d'un site de restriction se manifeste par la présence ou l'absence de celui-ci qui se traduit par un polymorphisme de la longueur des fragments de restriction. L'analyse RFLP est effectuée pour les produits de PCR obtenus pour les 10 isolats d'actinomycètes étudiés (CA36, CA37, CA46, CA44, CA48, CA49, CA49', CA302, CA304 et CA304') par l'enzyme de restriction Alu I qui coupe au niveau 5'---AGCT---3' et qui a permis d'obtenir un profil de bandes de différentes tailles qui nous permet de prédire que; les deux isolats CA46 et CA37 peuvent être de même espèce puisqu'elles ayant les mêmes bandes de même tailles de même pour les deux isolats CA304' et CA36. Les autres isolats (CA302 CA49' CA48, CA304, CA44) montrent différentes bandes qui correspondent aux différentes coupures. Alors que l'isolat CA304 n'avait pas de site de restriction 5'---AGCT---3' dans la partie d'ADNr 16S amplifié des actinomycètes.

Nous avons tenté de vérifier si le fragment amplifié à partir de l'isolat CA49 ne contient pas effectivement le site Alu I, ou seulement c'était un problème de pureté ou de concentration du produit à digérer. Le fragment est digérable avec les enzymes EcoRI et BglII. Ce résultat indique l'appartenance de l'isolat CA 49 à une autre espèce autre que celui des *Streptomyces*. Cependant, les caractéristiques macroscopiques et microscopiques de l'isolat CA49, indiquaient des caractéristiques semblables aux *Streptomyces*.

Les actinomycètes sont les bactéries les plus répandues pour leurs capacités de produire des métabolites à activité antimicrobienne (Larpen et al, 1989, Hilali et al, 2002). Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles molécules antimicrobiennes.

Les métabolites secondaires sont définis comme des composés de faible poids moléculaire de différentes natures non essentiels à la croissance des microorganismes. La synthèse de ces métabolites suit la phase de croissance active du microorganisme producteur.

Plusieurs paramètres peuvent conditionner la production des métabolites secondaires à effet antimicrobienne par les actinomycètes tels que la composition du milieu de culture, la température et le temps d'incubation. L'activité antimicrobienne des différents isolats d'actinomycètes a été mise en évidence par la méthode de diffusion sur gélose; qui permet de repérer les isolats qui sont actifs sur les souches indicatrices et d'évaluer la sensibilité de ces souches. (Duval et Soussy, 1990).



D'après les résultats, nous avons constaté que les bactéries à Gram positif tels que *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis* sont plus sensibles aux activités antimicrobiennes des isolats d'Actinomycètes que les bactéries à Gram négatifs *Escherichia coli* et *Erwinia Chrysanthemi*. C'est probablement la structure de leur paroi cellulaire, constituée principalement de peptidoglycane, qui rend ce groupe de bactéries plus sensible aux extraits. Par contre la paroi des bactéries à Gram négatif est formée d'une couche externe composée d'un complexe lipopolysaccharides, des phospholipides et des protéines. Cette couche est une barrière sélective ce qui les rend moins vulnérables que les bactéries à Gram positif.

Pour savoir l'influence de la température d'incubation sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs, les températures étudiées sont 30°C et 37°C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide SBR-22 est beaucoup plus étroite et varie entre 25 et 33°C (Sujatha et al, 2005). Les résultats obtenus par ce test montrent que 10 isolats d'actinomycètes n'ont pas d'activité sur tous les microorganismes testés. Pour les 2 températures d'incubation étudiés peut être qu'elles ne sont pas actives ou qu'elles exigent des conditions particuliers de culture et d'incubation pour avoir possibilité de production des métabolites biologiquement actifs comme exemple la production de jadomycine B chez *S. venezualae* est induit par qu'un choc thermique d'une heure (Doull et al.1993)

On peut remarquer que, la biosynthèse de la plupart des métabolites secondaires peut être réprimée par les sources d'azote rapidement assimilables, en particulier par l'ammonium (Aharonowitz, 1980 ; Demain, 1982 ; Piret et Demain, 1998). Des concentrations importantes en ammonium répriment certaines enzymes de dégradation des acides aminés comme la valine déshydrogénase (VDH) (Omura et al, 1983) ou la thréonine déshydrogénase (Vancura et al, 1988), enzymes impliquées dans la production de précurseurs indispensables à la biosynthèse d'antibiotiques. Donc La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement les rendements de production (Lebrihi et al, 1992).

D'après la bibliographie, la production de métabolites secondaires est la plupart du temps associée à une absence de croissance ou à une croissance faible et les concentrations en



Antibiotiques les plus élevées sont atteintes en phase stationnaire quand l'essentiel de la croissance est terminé (Martin et Demain, 1980). Les métabolites secondaires biologiquement actifs (antibiotiques, antifongiques,..) sont généralement liés et influencés par le métabolisme primaire de la bactérie productrice. Un ou plusieurs métabolites intermédiaires du métabolisme primaire servent fréquemment comme précurseur pour leur synthèse.

L'étude de l'activité des extraits des Actinomycètes porté sur des souches de références composé de 2 bactéries Gram positif (*Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) par la méthode de diffusion sur gélose.

Cette méthode permet de démontrer si un extrait est actif ou non par l'observation des zones d'inhibition autour du dépôt de l'extrait ou des disques imprègne par l'extrait. Ce dernier se propage sur la gélose de façon radiale inhibant ainsi la croissance des germes. L'inhibition est représentée sous forme de zone claire (ou zone d'inhibition) autour de la zone de dépôt de l'extrait. Les résultats obtenus lors de cette étude ont aussi montré une action et un degré de sensibilité variables des germes vis-à-vis de ces extraits.

Lorsqu'on a augmenté la concentration d'amidon de 5 g/l .8g/l et 10 g/l on a obtenus la production des métabolites à activité antibactériens ce qui est en étroite corrélation avec les données bibliographiques qui montre 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) (Lebrihi et al., 1988, Lounès et al., 1995a), les oligosaccharides (fructose, galactose, lactose) (Basak et Majumdar, 1973) ou les huiles (méthyloléate, huile de soja) (Park et al., 1994).

La fraction F2 a montré une forte activité antibactérienne, et semble aguichante pour une purification et caractérisation spectroscopique afin d'identifier sa structure et son potentiel comme antibiotique.



## VI. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Notre travail a porté sur l'isolement de nouvelles souches d'actinomycètes à partir du sol, le criblage de ces souches vis-à-vis de la production de substances antimicrobiennes ainsi que l'extraction, la purification et la caractérisation préliminaire de ces substances.

- Nous avons pu isoler vingt-neuf isolats d'actinomycètes à partir des échantillons de sol de différents sites.
- L'identification de ces isolats a été réalisée par une approche taxonomique moléculaire se basant sur l'amplification partielle de l'ADNr 16S et par une analyse RFLP des produits de PCR. permet de prédire l'appartenance des isolats (CA304 CA304', CA44, CA46, CA48, CA49', CA302, CA36, CA37) au genre *streptomycetes*
- Sur les vingt-neuf souches d'actinomycètes isolées, 17 isolats sont actives sur au moins une des souches-tests étudiées (*E. coli*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *E chrysenthemi*).
- L'analyse qualitative des différents extraits est effectuée par une chromatographie sur couche mince

Enfin, nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi car plusieurs perspectives peuvent être envisagées :

- ✓ Préciser l'identification des souches isolées par des tests chimio-taxonomiques et des analyses phylogénétiques basées sur d'autres marqueurs moléculaires.
- ✓ Détermination du spectre d'action des substances produites sur d'autres bactéries et en particulier sur des bactéries multi-résistantes.
- ✓ Etude structurale et identification complète de chacune des molécules bioactives produites par le biais des techniques chromatographiques et spectrométriques
- ✓ Optimisation des paramètres cultureux afin d'améliorer la production d'antibiotiques



## VII. REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

### A

- Aoki, H., Sakai, H., Kohsaka, M., Konomi, T. & Hosoda, J, (1976) Nocardicin A, a new monocyclic beta-lactam antibiotic. I. Discovery, isolation and characterization. *J.Antibiot.*, 29, 492-500.
- Aharonowitz, Y. & Demain, A.L, (1978) Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 14, 159- 164
- Alexander. (1961). Introduction to soil microbiology. John Wiley, New York
- Adinarayana K, Ellaiah P, Srinivasulu B, Bhavani DR, Adinarayana G. (2003) Response surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by *Streptomyces marinensis* under solid-state fermentation. *Process Biochem.* 38: 1565-1572.
- Ahmed ZU, Shapiro S, Vining LC. (1984) Excretion of  $\alpha$ -keto acids by strains of *Streptomyces venezuelae*. *Can. J. Microbiol.* 30: 1014-1021.
- Arshad, M. et W. T. Frenkenberger, Jr. (1992). Microbial production of plant growth regulators, p. 307-347. *In* F. Blaine Metting, Jr (ed), *Soil Microbiol Ecology. Application in agricultural and environmental management*. Washington.

### B

- Bhavdish, N., A. Johri, J. Sharma , S. Viridi.( 2003). Rhizobacterial diversity in India and its influence on soil and plant health. *Advan. Bioche. Engin. Biotech.* 84: 49-89.
- Basak K, Majumdar SK. (1973) Utilization of carbon and nitrogen source by *Streptomyceskanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4: 6 10.
- Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites: Review article. *J. Antibiot.* 58: 1–26



- Braña, A.F., Wolf, S. and Demain, A.L. (1985) Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can. J. Microbiol.*, 31, 736-743.
- Boudjella, H. (1994) Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèce d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Algérie.
- Boughachiche F, Reghioia S, Oulmi L, Zerizer H, Kitouni M, Boudemagh A (2005). Isolation of actinomycetes producing antimicrobial substances from Sebkhia Ain Mlila. *Sci. Technol.* 23:5-10.
- Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A., (1965). Chemical composition of cell-wall preparation from strains of various from-fgenera of aerobic actinomycètes. *Appel microbiol.*, 13, 236\_243.
- Bouras N, Merrouche R, Lamari L, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A. (2008) Precursordirected biosynthesis of new dithiolopyrrolone analogs by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Process Biochemistry.* 43: 1244-1252.

## C

- Castro JM, Liras P, Cortes J, Martin JF. (1985). Regulation of a-aminoadipylcysteinyl- valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C
- Chun J ., Blackall L. L., Kang S., Hah Y.C and Goodfellow M., (1997). A proposal to reclassify *Nocardia pinensis* Blackall et al .as *Skermania piniformis* gen .Nov ., comb. Nov. Int . J . Syst. Bact.47, 127-131
- CRAWFORD D.L., LYNCH J.M., WHIPPS J.M., OUSLEY M.A. (1993). Isolation and characterization of actinomycete antagonists of fungal root pathogen. *Appl. Environ Microbiol* **59**:3899-905.
- Chmiel, A. (1986) Oxygen limitation in citric acid biosynthesis by *Aspergillus niger* witthe high mycelium density. *Acta Microbiol. Pol.*, 35, 321-323.
- Cohn, F. (1875). Untersuchungen über Bacterien II. *Beitr Biol* **1**, 141-207.



- CrossT., (1981). Aquatic actinomycetes : a critical survey of the occurrence growth and role of actinomycètes in aquatic habitats . .J. Appl. Bacteriol.50, 397-4

## D

- DAVIES F.L. et WILLIAMS S.T., (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil. 1/ The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. Soil. Biol Biochem. 2: 227-238.
- Dietera, A., Hamm, A., Fiedler, H. P., Goodfellow, M., Muller, W. E., Brun, R. et Bringmann, G. (2003). Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkalophilic *Streptomyces* strain. J. Antibiot. 56: 639-646.
- Demain A.L. (1995). Emerging concepts of secondary metabolism in Actinomycetes *Actinomycetologica*. 9:98-117.
- Decre D. et Courvalin P. (1995). L'intérêt d'antibiotiques nouveaux. Bull.Soc. Fr. Microbiol. 12(2), 160-175.
- Demain, A.L. (1989) Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: Regulation of secondary metabolism in actinomycetes. Shapiro, S., editor Boca Raton, FL: CRC Press, 127-134
- Demain, A.L. (1982) Catabolite regulation in industrial microbiology, In: Overproduction of microbial products, (Eds)V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek, Academic Press, New York, 3-20.
- Dietera, A., Hamm, A., Fiedler, H. P., Goodfellow, M., Muller, W. E., Brun, R. et Bringmann, G. (2003). Pyrocoll, an antibiotic, antiparasitic and antitumor compound produced by a novel alkalophilic *Streptomyces* strain. J. Antibiot. 56: 639-646.
- Donadio, S., Monciardini, P., Alduina, R., Mazza, P., Chiocchini, C., Cavaletti, L., Sosio, M. & Anna, P.M. (2002) Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. J. Biotechnology, 99, 187-198.
- Données OMS. (1997)."Principales causes de mortalité dans le monde en 1996".
- Donadio S, Monciardini P, Alduina R, Mazza P, Chiocchini C, Cavaletti L, Sosio M, Puglia AM. . (2002) Microbial technologies for the discovery of novel bioactive metabolites. Biotechnol99:187-198



- 
- Doull, J.L., Ayer, S.W., Singh, A.K. & Thibault, P. (1993) **Production of a novel** polyketid antibiotic, Jadomycin B, by *Streptomyces venezuelae* following heat shock. *J Antibiot.*, 46, 869-871.
  - Duval J, Soussy C J Abrégé de l'antibiothérapie 4<sup>ème</sup> ed Masson, Paris, 1977, 1990 : 75 – 100
  - Dvorak A., Johnston A. (1999). Actinomycetes and Streptomycetes. New York.23p

## E

- Ensign J. C., Normand P., Burden J.P. and Yallop C ;A.,(1993). Physiology of some actinomycete genera *Res microbiol* 144,657-660
- El-Tarabily, K. A .(2008). Promotion of tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) plant growth by rhizosphere competent 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid deaminase-producing streptomycete actinomycetes. *Plant and Soil*. **308**: 161-174.
- Eunice J. A. and Prosser J.i., (1983). Mycelial growth and branching of streptomycetes coeicolor.A3(2) on solid medium. *J. gen . Microbiol.* 129,2029\_2036

## F

- Furuya EY, Lowy FD. (2006) Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat. Rev. Microbiol.* 4: 36-45.

## G

- Goodfellow, M. & Williams, S.T. (1983) Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 189-216.
- Gottlieb D.,(1973). General consideration and implication of the actinomycetales. In : Actinomycetales characteristics and practical importance. Edited by G.Sykes and F.A Skinner Academic Press, London, New York.
- GOODFELLOW M, JONES AL, MALDONADO LA, SALANTRO J. (2004). *Rhodococcus aethrivorans* sp. Nov., a new species that contains methyl-t-butyl ether degrading actinomycetes. *Syst. Appl. Microbiol.* 27:61-5.



- Gonzalez, R., Islas, L., Obregon, A.M., Escalante, L., & Sanchez, S. (1995) Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea* : stimulatory effect of ammonium. *J. Antibiot.*, 48, 715-719.

## H

- Higashide E. (1984). "The macrolides: properties, biosynthesis and fermentation" *Drugs pharm.Sci.*, 22, , pp. 452-508.
- HSU S.C., LOCKWOOD J.L., (1975). Powder chitin agar as selective medium for enumeration of actinomycetes in water and soil. *Appl. Microbiol. Technol.* 66: 559-565.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ Smith CP, Ward JM, Schrempf H. (1985) Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual. Norwich, UK: John Innes Foundation..
- Hilali H., Khattabi A., Nssarlah N., Malki A., Finance C.,(2002). Isolement de nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Biol. Biotechnol*, 2(1), 49-53.

## I

- Iwai Y., Takahashi Y. (1992). "Selection of microbial sources of bioactive compounds" in «The search for bioactive compounds from microorganisms», Springer-Verlag, New York, (Ed.), pp. 281-302.

## J

- Jeffrey, L. S. H., (2008) "Isolation, characterization and identification of actinomycetes from agriculture soils at Semongok, Sarawak," *African Journal of Biotechnology*, Vol. 7, n°. 20, pp. 3697-3702, October,.

## K

- Krassilnikov, N. A., Koreniako A. I. and Artamonova O. I. (1953). Distribution of antagonistic Actinomycetes in soils. *Microbiology (U.S.S.R.)*, 22: 3



- Krasilnikov.(1958). Soil Microorganisms and higher plants office of technical services. US. Dept of commerce. Washington
- Kieser, T ., J. Bibb, M. J. Buttner, K.F. Chaiter, and D.A. Hopwood(ed).(2000).Practical streptomycetes genetics.The John Innes Foundation, Norwich

## L

- Lechevalier H.A., and lechevalier M.P.(1981). Introduction to the order actinomycétales In the prokaryotes,Vol.2 (StarrM.P.Stolp,H.G.Truper,.A.Ballomsans H.GSchlegel.Eds.),Springer\_Verlag,Berlin.p.1915-1922
- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P., (1967). Biologie of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 21 :71-100.
- LARPENT J.P. et SANGLIER J.J., (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris 481 p.
- Locci, R. & Sharples, G.P. (1984) Morphology. *In: "The biology of Actinomycetes"*. Goodfellow, M., Mordarski, M. & Williams, S.T. (Eds.) Academic Press, London., UK, 165-199.
- Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. & Germain, P. (1995) Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Cur. Microbiol.*, 31, 304-311.
- Lebrihi A, Lamasaf D, Lefebvre G, Germain P. (1992) .Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 37: 382-387.
- Lebrihi, A., Lefebvre, G. & Germain, P. (1988) Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 44-51.
- Liras, P., Asturias, J.A. & Martín, J.F. (1990) Phosphate control sequences involved in transcriptional regulation of antibiotic biosynthesis. *Tibtech.*, 8, 184-189
- Lacey J. (1997). Actinomycetes in compost. *Ann Agric Environ Med.* 4: 113–121.



- Livermore DM, Brown DF, Quinn JP, Carmeli Y, Paterson DL, Yu VL (2004) . Should third-generation cephalosporins be avoided against AmpC-inducible Enterobacteriaceae? *Clin Microbiol Infect* 2004; **10**: 84–5.DOI:
- Locci R., (1976). Developmental micromorphology of actinomycetes. In actinomycetes ,The boundary microorganisms Arai T.Ed., Tokyo. 170\_180
- LabedaD. P., (1992). DNA-DNA hybridation in the systematics of streptomyces. *Gene* 115 :249-253

## M

- Marinelli F. (2009) Antibiotics and *Streptomyces*: the futur and antibiotic discovery. *Microbiology today*. 2: 20-23
- Mazodier J., (1974). Sociétés industrielles et déchets solides. *Science et vie* . 106, 109\_109\_115
- Muyzer G., De Waal E. C. and UitterlindenA. G., (1993) . Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59,695-700
- Mariat F. et SebaldM.,(1990) . Les actinomycètes . Dans .Bactériologie médicale. Le Minor . Edition Médecine-Science.Flammarion.France
- Mahadevan, B et D. L. Crawford. (1997). Properties of the chitinase of the antifungal biocontrol agent *Streptomyces lydicus* WYEC108. *Enzy. Microb. Technol.* 20: 489-493.
- Morel R. (1996). Les sols cultivés, 2 éd. Paris : Tech.Doc :389p
- Miyairi, N., Miyoshi, T., Aoki, H., Kohsaka, M., Ikuushima, H., Kunugita, K., Sakai, H. & Imanaka, H. (1970) Studies on thiopeptin antibiotics. I. Characteristics of thiopeptin B. *J. Antibiot.*, 23, 113-119.
- Miguez, E.M., Hardisson, C., and Manzanal, M.B. (2000) *Streptomyces*: a new model to study cell death. *Int Microbiol* **3**: 153–158. Molle, V., and Butt



- Mitsuiki, S., Sakai, M., Moriyama, Y., Goto, M. et Furukawa, K. (2002). Purification and some properties of keratinolytic enzyme from an alkalophilic *Nocardioopsis* sp. TOA-1. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 66: 164-167.
- Murthy R. (2001) Implementation of strategies to control antimicrobial resistance. *Chest*; 119(suppl 2):405-11.
- Mincer, T. L., P. R. Jensen, C. A. Kauffman et W. Fenical. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *App. Environ. Microbiol.* 68: 5005-5011.

## O

- Omura S, Tanaka Y, Hamada H, Masuma R. (1984) Effect of ammonium ion, inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone. *J. Antibiot.* 37: 494-502
- Okami Y. and Hotta K. (1988). "Search and discovery of new antibiotics" in «Actinomycetes in biotechnology». *Academic Press, Orlando* (Ed.), pp.33-67.
- Oskay M, Tamer AU, Azeri C. (2004) Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of turkey. *African Journal of Biotechnology.* 3: 441-446.
- Ottow J. C. G. and Glathe H., (1968). Rose Bengal-malt extract- agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl. Microbiol.* 16. 170\_171

## P

- Piepersberg, W. & Distler, J. (1997) Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In : Products of secondary metabolism, *Rehn H-J & Reed G, editors. Vol. 7. Weinheim: VCH, 397-488*
- Piret, J.M. & Demain, A.L. (1988) Actinomycetes in biotechnology: an overview, *In: Actinomycetes in biotechnology.* (Eds) Goodfellow, M., Mordarski, M & Williams S.T., *Academic Press, London, 461-482*



- Park YS, Momose I, Tsunoda K, Okabe M. (1994) Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 40: 773-779.
- Prapagdee, B, Kuekulvong, C and Mongkolsuk, S. (2008). Antifungal potential of extracellular metabolite produced by *Streptomyces hygroscopicus* against phytopathogenic fungi. *Int. J. Biol. Sci.* 4: 330- 337.
- Ploy MC, Lambert T, Gassama A, (2000) Denis F. Place des intégrons dans la dissémination de la résistance aux antibiotiques. *Annales de Biologie Clinique*58: 439-

44. - Prescott L., Harley JP., Klein DA. *Microbiologie*. 2<sup>ème</sup> édition, chapitre 25. 1993; 506- 517.

- Perry, D.A., Tone, J. & Maeda, H., (2004) Antiparasitic menaquinones from *Saccharothrix*. (Pfizer Ltd., UK). *Brit. UK Pat. Appl.*, 28-109.
- Poly M. C., Gerland C., Martin D., Lumeley L., Denis F., (1998). First clinical isolate of vancomycin intermediated staphylococcus aureus in french hospital. *Lancet* ; 351 ; 1212

## R

- Reponen T. A ., Gazonko S. V., Grinshpun S. A., Willeke K. and Cole E. C ., (1990) . Characteristics of airborne actinomycete spores . *Appl. Environ. Microbiol.* 64,3807\_3812
- Rybak MJ. (2004) Resistance to antimicrobial agents: an update. *Pharmacotherapy*; 24(suppl 12):203-15.
- Ravel, J., E. M. H. Willington et R. T. Hill. (2000). Interspecific transfer of *Streptomyces* giant linear plasmids in sterile amended soil microcosms. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 529-534.
- Russell AD, Maillard JY. (2000) Reaction and response: Is there a relationship between antibiotic resistance and resistance to antiseptics and disinfectants among hospital-acquired and community-acquired pathogens. *Am. J. Infect. Control.* 28: 204-206.



## S

- SANGLIER J.J. et TRUJILL M., (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. Bull.Soc.Fr. Microbiol. **12(3)**, 269-276.
- SHEARER MC., (1997). Methods for the isolation of non-streptomycetes actinomycetes. J Ind Microbiol 28: 91-8.
- Shomura T, Yoshida J, Amano S, Kojima M, Inouye S, Niida T. (1979) Studies o Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. J. Antibiot. 5: 427-435.
- Stapley E.O., Woodruff H.B, (1982). Avermectins, antiparasitic lactones produced by *Streptomyces avermitilis* isolate from a soil Japan. In : *Trends in antibiotic Research*.Japan. : 154-170.
- Solé, M., Rius, N. & Lorén, J.G. (2000) Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Internat. Microbiol.*, 3, 39-43.
- Stanier R.Y., Doudoroff M. et Adelberg E.A. (1966). Microbiologie generale, Masson.Paris
- Sujatha P, Bapi-Raju KV, Ramana T. (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-40 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. Microbiol. Res. 160: 119-126.
- Silvey J. K. G. and Roach A. N., (1975). The taste and odor producing aquatic actinomycètes Crit. Rev. Environ. Control. 5,233-273

## T

- Tanaka Y, Taki A, Masuma R, Omura S. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylenolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. J. Antibiot. 39: 813-821.
- Tomita, K., M. Nishito, K. Sitoh, H. Yamamoto, Y. Hashino, H. Okhuma, M. Konishi, T. Miyaki et T. Oki. (1990). Pramucidins A, B and C: new antifungul antibiotics. I. Taxonomy, production and physico-chemical properties. J. Antibiot. 43: 755-762



- Tsuijibo, H., Kubota, T., Yamamoto, M., Miyamoto, K. et Inamori, Y.(2003). Characteristics of chitinase genes from an alkalophilic actinomycete, *Nocardioopsis prasina* OPC-131. App. Environ. Microbiol. 69: 894-900

## U

- Untrau S, Lebrihi A, Lefebvre G, Germain P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. Curr. Microbiol. 28: 111-118.

## V

- Vining L.C. (1992). Secondary metabolism: Inventive evolution and biochemical diversity. *Gene*. 115:135-140.

## W

- WAKSMAN S.A., (1967). Distribution, isolation and methods of study. In : The actinomycetes- a summary of current knowledge. The Ronald Press Company. New York. pp: 9-21
- WAKSMAN S.A. (1963). Ma vie avec les microbes. Albin. Michel (ed.), 280 p.
- WAKSMAN S.A., HENRICI A.T., (1943). The nomenclature and classification of the actinomycete. *J. Bacteriol.* 46: 337-341.
- WOO JUNG-HEE, KITAMURA ETSUSHI et al., (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strains AP77 is specific for phythium porphyrae, a causative agent of red rot disease in porphyra spp. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**: 2666-2675.
- Williams S.T., Wellington E.M.H. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: M. Goodfellow. The biology of the Actinomycetes. London: 481-528.
- WILLIAMS S.T, GOODFELLOW M., ALDERSON G., (1989). Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici (1943). In "Bergeys manual of systematic bacteriology, Vol 4 ed. Williams S.T., Sharpe M.E., Holt J.P. Baltimore: Williams and Wilkins. Pp. 2452-24



- ~~Watson, E.T. and Williams S.T. (1974). Studies on the Ecology of Actinomycetes in Soil-VII: Actinomycetes in a Coastal Sand Belt, *Soil Biology and Biochemistry*, 6, 43–52.~~

## X

- Xu LH, Li QR, Jiang CL. (1996). Diversity of soil actinomycetes in yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 244-248.

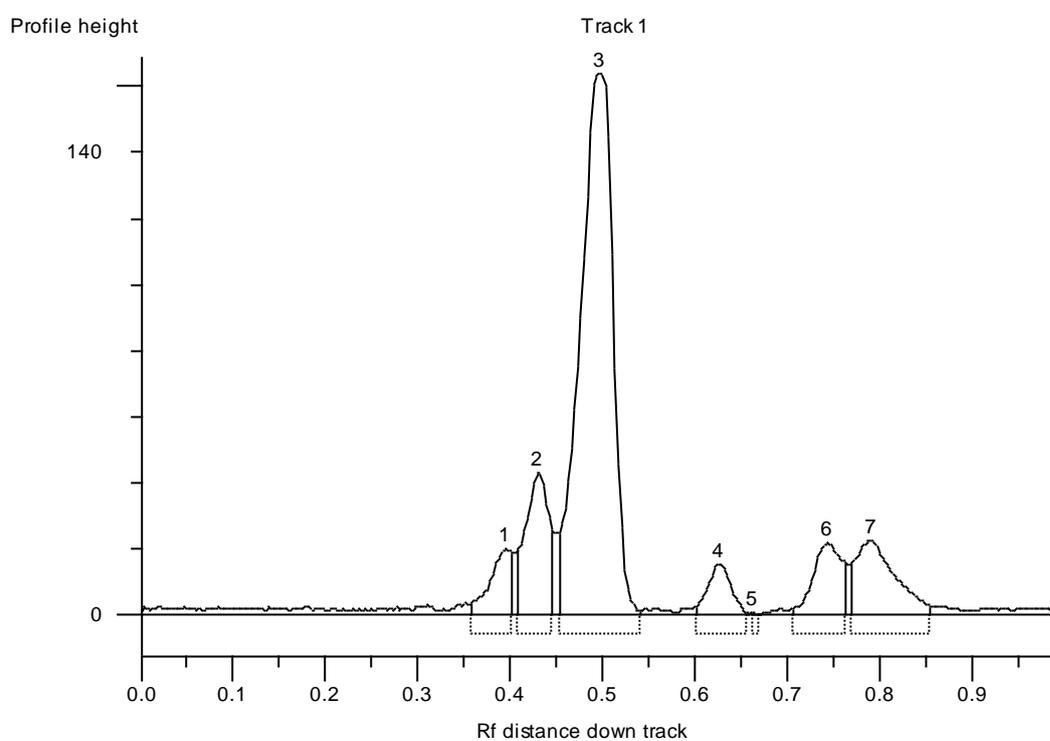
## Z

- Zahir, A. Z., M. Archad et A. Hussain. (1996). Response of wheat ( *Triticum aestivum*) to *Azotobacter* inoculation under fertilized conditions. *Sarhad. J. Agri.* 12: 133-140
- Zahir, A. Z., M. Archad, M. Azam et A. Hussain. (1997). Effect of an auxin precursor tryptophan and *Azotobacter* inoculation on yield and chemical composition of potato under fertilized conditions. *J. plant. Nutr.* 20: 475-752
- ZITOUNI A., LAMARI L., BOUDJELALE H., BADJI B., SABAOU N., GAOOUAR A., *et al.*, (2005). *Saccharothrix algeriensis* sp. Nov., isolated from a sahara soil. *IJSEM*
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N; (2005), *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria, Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology.* 156: 984-993.



## VIII. Annexes

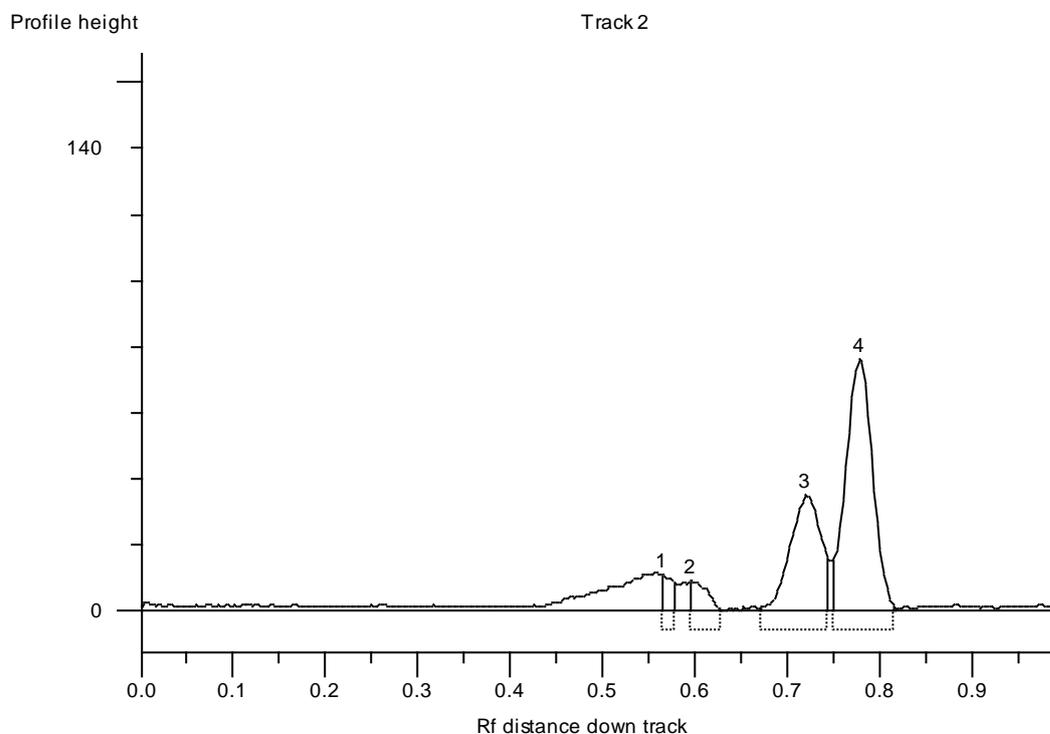
Comparaison entre les profils RFLP des différents isolats. Les tableaux montre les paramètres relatifs aux tailles des fragments et de leurs intensité.



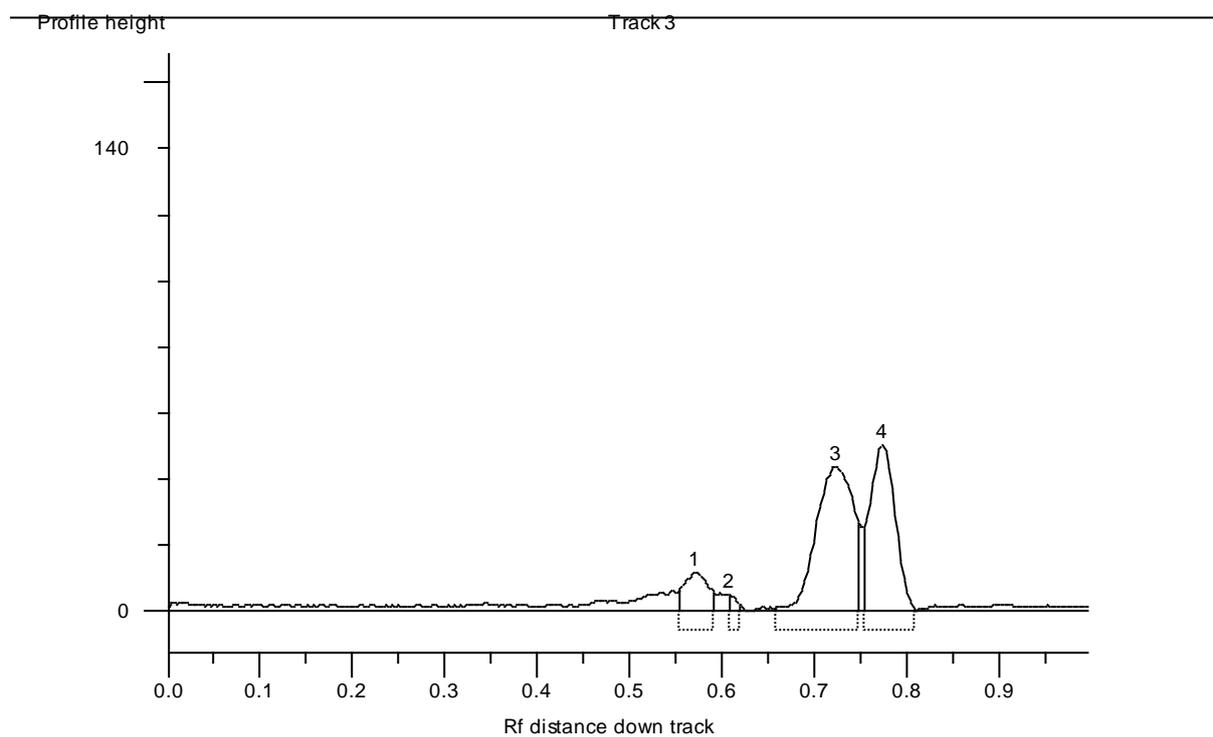
Isolat CA48		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	800.00	20.127
2(m)	766.27	42.922
3(m)	703.02	163.822
4(m)	412.96	15.532
5(m)	327.77	0.851
6(m)	178.26	21.957



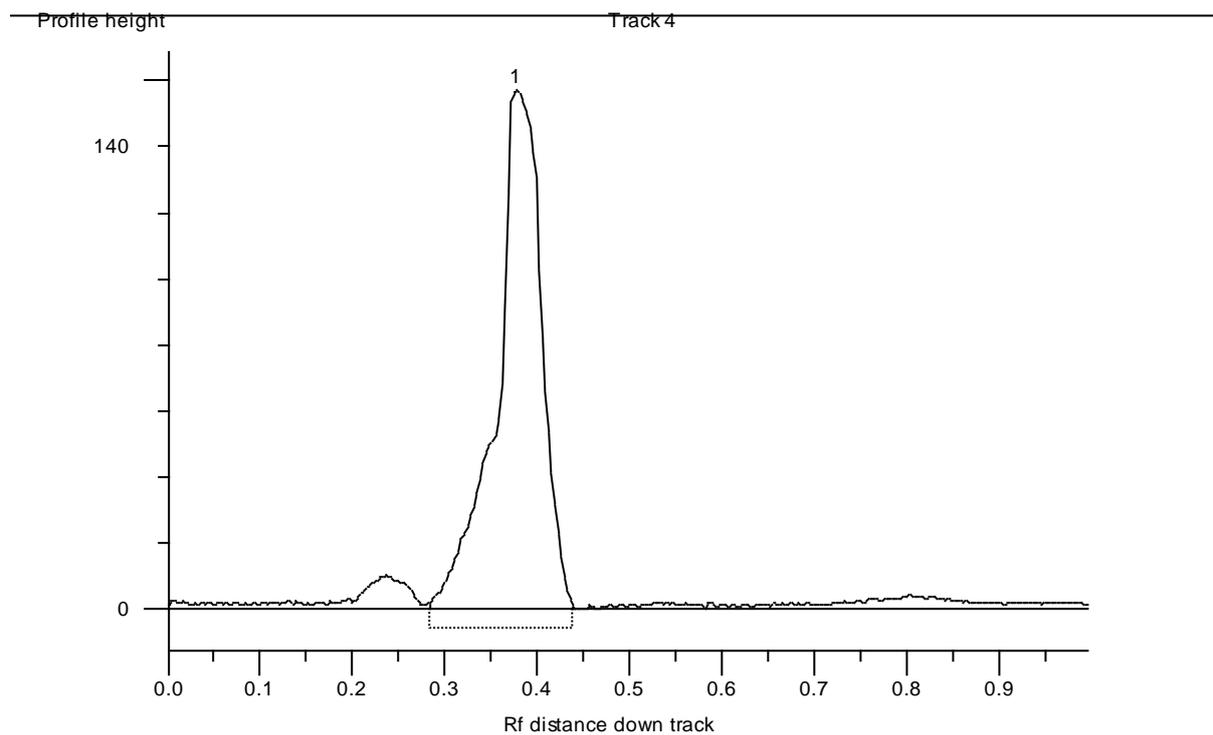
Z(m)	134.82	22.860
------	--------	--------



Isolat CA37		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	533.23	10.980
2(m)	476.65	9.091
3(m)	205.88	35.181
4(m)	146.83	76.619

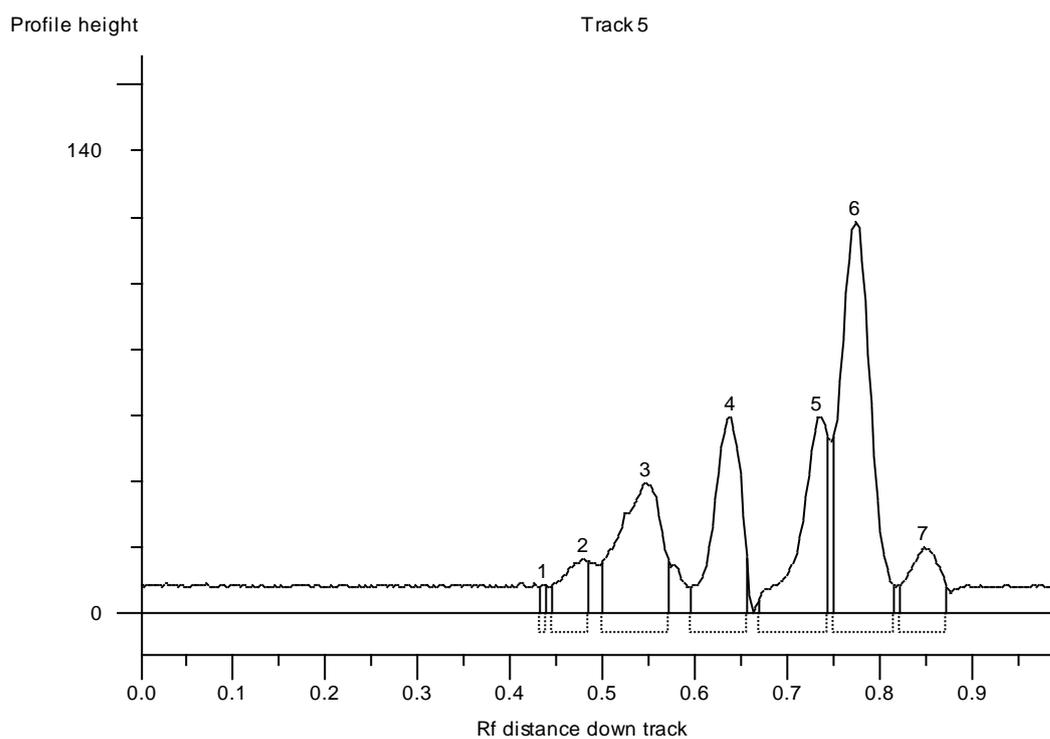


Isolat CA46		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	521.92	11.596
2(m)	447.21	4.901
3(m)	200.00	43.533
4(m)	150.00	50.358



Isolat CA49		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	854.10	157.236

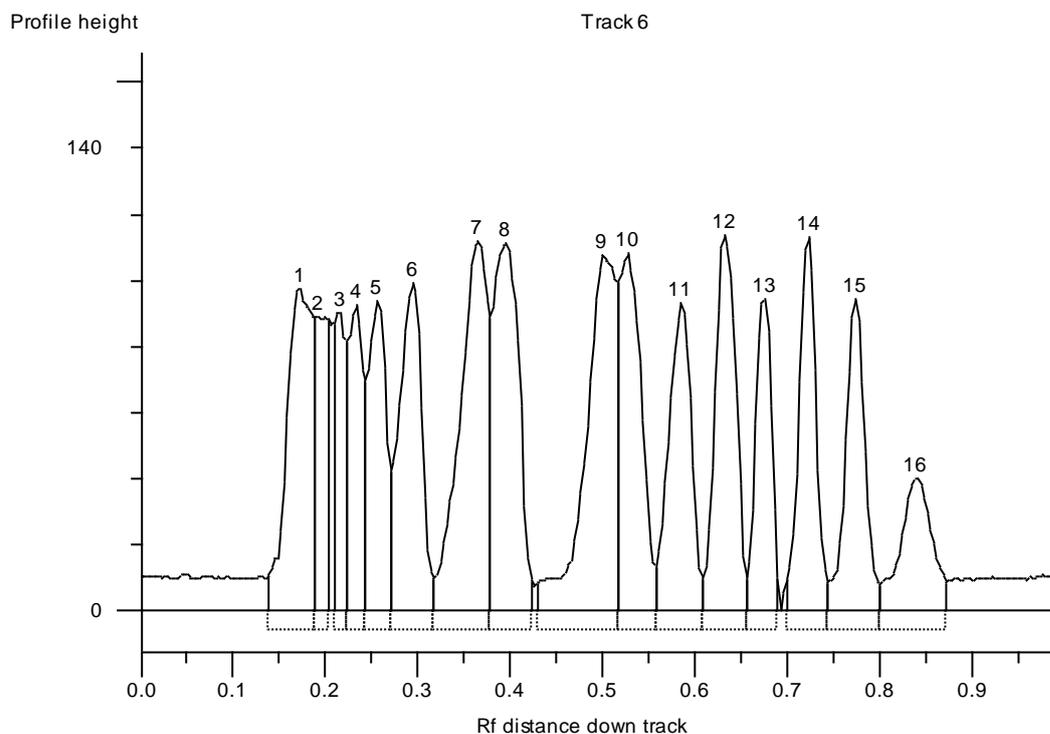
**Track 5**





Isolat CA302		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	759.70	8.583
2(m)	718.33	16.652
3(m)	562.61	39.767
4(m)	382.68	59.329
5(m)	188.82	59.637
6(m)	150.00	118.830
7(m)	93.80	20.476

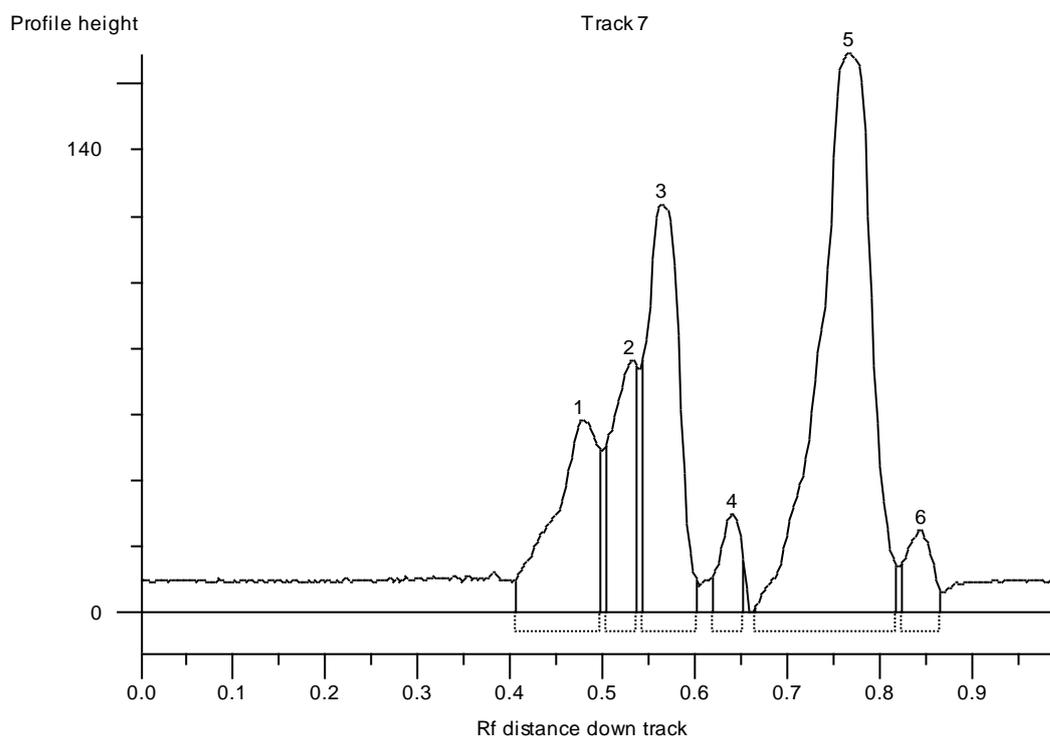
**Track 6**



Marqueur de taille		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	4000.00	97.189
2(m)	3000.00	88.970
3(m)	2500.00	90.377
4	2000.00	92.405
5	1500.00	93.570



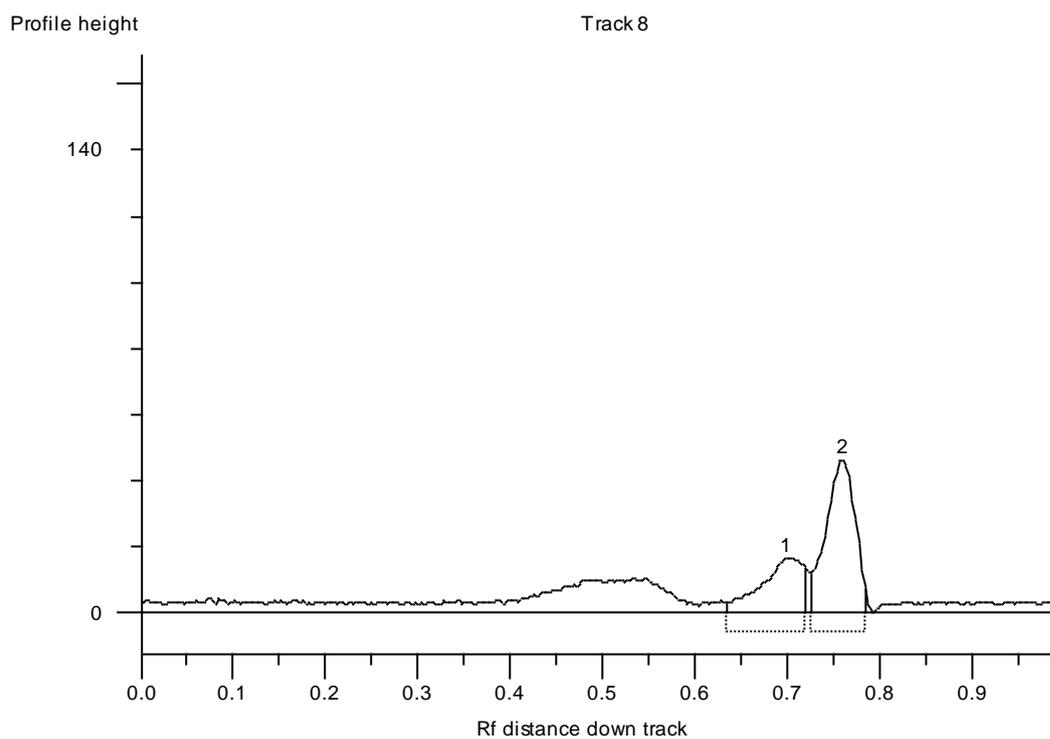
6	1000.00	99.533
7	900.00	111.884
8(m)	800.00	111.530
9(m)	700.00	107.598
10	600.00	108.022
11	500.00	93.217
12	400.00	113.765
13	300.00	94.146
14(m)	200.00	113.238
15(m)	150.00	94.590
16	100.00	40.135



Isolat CA49'		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	721.43	58.353
2(m)	593.60	76.222

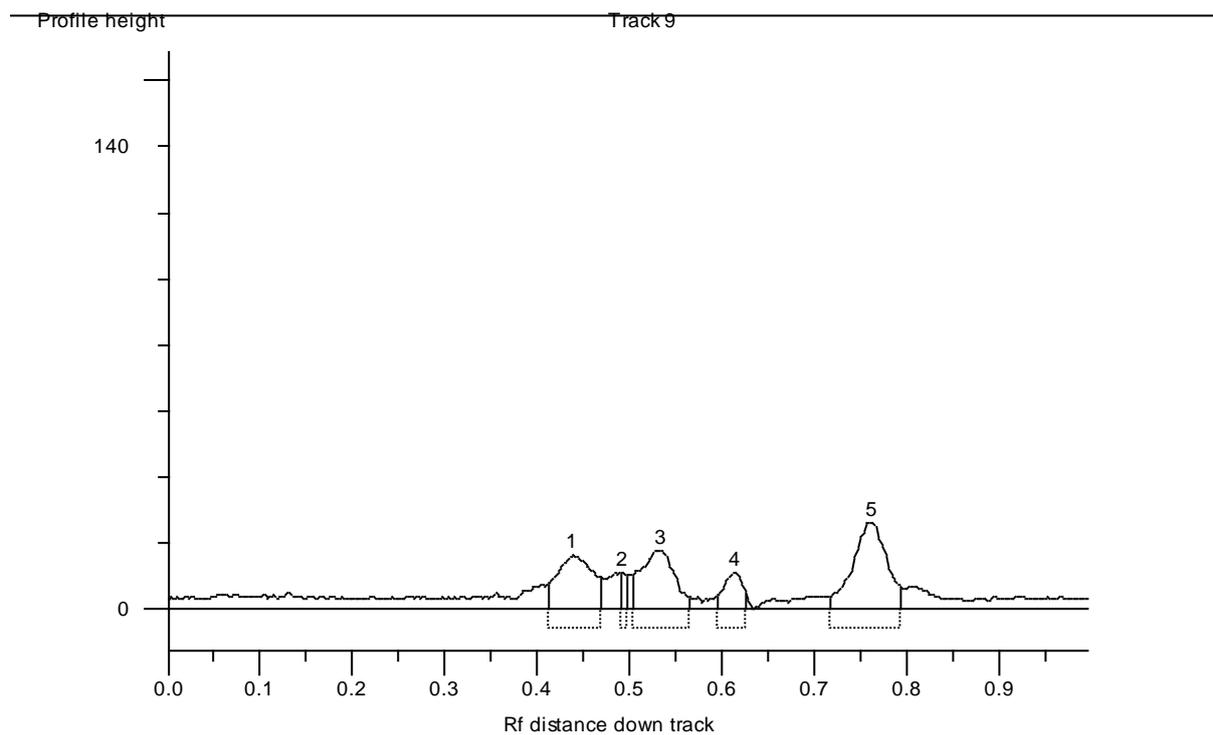


3(m)	533.23	123.558
4(m)	374.31	30.142
5(m)	155.87	169.566
6(m)	95.82	24.881

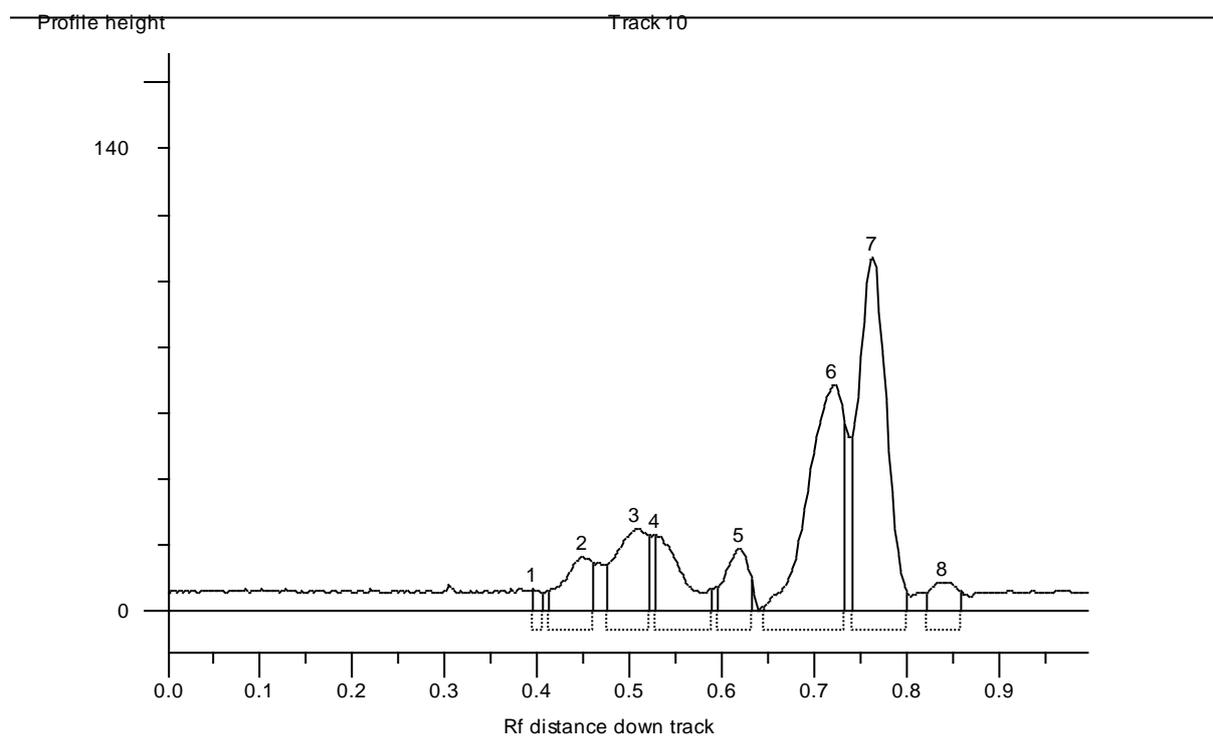


Isolat CA304		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	244.95	16.622
2(m)	161.96	46.283

Track 9

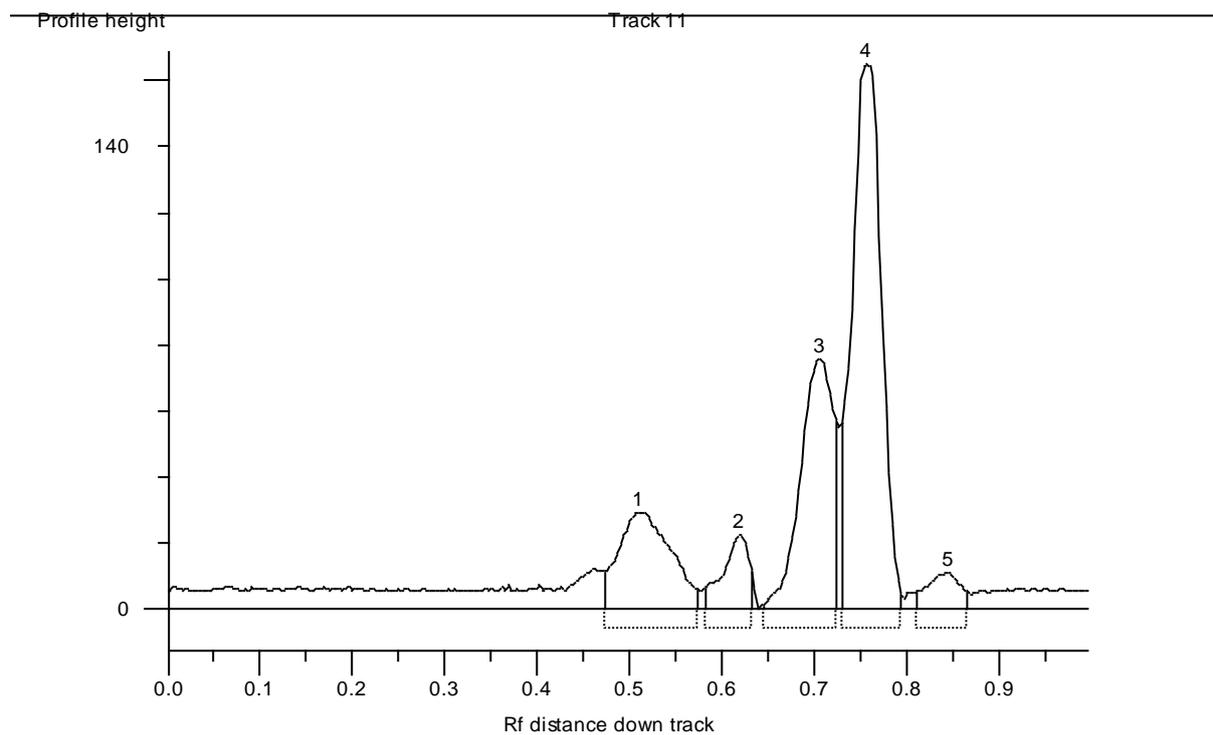


Isolat CA44		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	756.43	16.481
2(m)	706.06	10.987
3(m)	587.27	18.038
4(m)	433.18	11.241
5(m)	158.88	26.481



Isolat CA36		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	800.00	7.049
2(m)	746.72	16.786
3(m)	673.54	25.031
4(m)	600.00	23.069
5(m)	426.33	18.820
6(m)	205.88	68.677
7(m)	158.88	107.256
8(m)	100.00	8.997

Track 11



Isolat CA304'		
Number	Mol. weight	Height
1(m)	660.68	29.466
2(m)	426.33	22.376
3(m)	231.16	75.453
4(m)	165.10	165.125
5(m)	95.82	11.070

**Molecular weight calibration details**



## Résumé

29 souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sol. L'identification macroscopique des isolats montre une variété des caractères morphologiques, 10 isolats sont caractérisés par PCR donnent un seul produit d'amplification d'environ 1400 pb. L'analyse RFLP est effectuée sur les produits de PCR obtenus pour les 10 isolats par l'enzyme de restriction Alu I permet d'obtenir différents profils.

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes a été déterminé par la méthode de gélose molle contre deux bactéries Gram positives (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*) et 2 Gram négatives (*Escherichia coli* et *Erwinia chrysanthemi*) à deux températures d'incubation de 30°C et 37°C. Parmi les 29 isolats, 17 souches ont montré une activité contre au moins une bactérie tests étudiées. Les isolats semblent être plus actifs sur les bactéries à Gram positifs que sur les bactéries à Gram négatifs; la température de 30°C favorise bien la production des métabolites secondaires biologiquement actifs.

Ces isolats ont été cultivés par culture liquide afin de produire des extraits riches en métabolites secondaire à partir du surnageant.

L'extrait 304 a été choisit suite à son activité antibactérienne remarquable pour la production d'une molécule antibactérienne. La production a été faite sur le milieu CS liquide et la purification a été réalisée par les méthodes chromatographiques. Cette molécule a montrée une activité prometteuse contre *B. subtilis* et *S. aureus* avec des CMI (concentration minimale inhibitrice) de 14.3 µg/ml et 35.2 µg/ml.

