



Année Universitaire : 2012- 2013



**Master Sciences et Techniques : Biotechnologie microbienne**  
**MEMOIRE DE FIN D'ETUDES**

Pour l'Obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Evaluation de l'activité antimicrobienne des  
différents isolats d'actinomycètes**

**Présenté par:**  
BENTABET Loubna

**Encadré par:**  
Pr. HAGGOUD Abdelatif FST-Fès  
Pr. IRAQUI HOUSSAINI MOHAMMED FST-Fès

**Soutenu Le20 Juin 2013 devant le jury composé de:**

Pr. ANNANOU SAMIR	FST-Fès	Examineur
Pr. BOUKIR Abdelatif	FST-Fès	Examineur
Pr. HAGGOUD Abdelatif	FST-Fès	Encadrant
Pr. IRAQUI HOUSSAINI MOHAMMED	FST-Fès	Encadrant



## Lieu du stage : Laboratoire de Biotechnologie Microbienne



Mémoire de fin d'études pour l'obtention du Diplôme de Master Sciences et Techniques

**Nom et prénom: BENTABET Loubna**

**Année Universitaire : 2012 - 2013**

**Titre: Evaluation de l'activité antimicrobienne des différents isolats d'actinomycètes**

### Résumé

Dans ce travail, nous nous sommes intéressés à la recherche de substances antifongiques et antibactériennes à partir de 12 isolats d'actinomycètes. L'activité antimicrobienne a été d'abord testée sur différents milieux de culture afin d'évaluer le meilleur milieu de production. Ensuite, le spectre d'activité des différents isolats a été déterminé contre des bactéries à Gram positif, des bactéries à Gram négatif, des levures et des champignons filamenteux. Ainsi, parmi les 12 isolats, 9 ont montré une activité contre au moins un des microorganismes test.

En outre, les extraits organiques de trois des isolats étudiés ont été préparés et fractionnés par chromatographie sur couche mince (CCM). Ensuite, les bandes responsables de l'activité antimicrobienne ont été identifiées par bioautographie.

Afin de déterminer le mode d'action des substances produites, nous avons étudié leur action sur la paroi de *S. aureus*. Les expériences réalisées suggèrent que les substances bioactives agiraient au niveau de la paroi de ces bactéries.

Par ailleurs, une caractérisation physiologique et biochimique des isolats a été entreprise. Ainsi, la synthèse de certains pigments (melanoides, flavonoides et polyphénols) par les isolats et leur croissance en fonction du pH a été évaluée. Enfin, l'amplification par PCR et le séquençage de l'ADN r16S de l'isolat H15 a permis son assignation au genre *Streptomyces*.

**Mots clés:** Actinomycètes ; Activité antibactérienne ; Activité antifongique; effet sur la paroi ; flavonoides ; polyphénols ; melanoides, CCM, identification moléculaire.



## I. Actinomycètes.

### 1. Propriétés générales des actinomycètes.

Les actinomycètes sont des bactéries à Gram-positif capables de former des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés, habituellement non fragmentés, leur croissance donne lieu à des colonies circulaires (Gottlieb, 1973 ; Lechevallier et Lechevallier, 1981) ; Les actinomycètes ont un coefficient de Chargaff (G+C%) supérieur à 55 %, généralement compris entre 60 et 75% (Ensign, 1978 ; Larpent et Sanglier, 1989 ; Chun *et al.*, 1997).

Comme les autres bactéries à Gram-positif, leur paroi cellulaire est constituée d'une épaisse couche de peptidoglycane qui joue un rôle important dans le maintien de la rigidité cellulaire ainsi que dans la protection physique de la membrane sous-jacente.

Les glucides de la paroi permettent une séparation en quatre groupes majeurs (Lechevalier, 1968). Le spectre de sucre A (arabinose, galactose) est caractéristique de la grande majorité des nocardioformes (*Nocardia*, *Saccharopolyspora*). Le spectre glucidique B (madurose, 3-O-méthyl-D-galactose) est présent chez les maduromycètes (*Actinomadura*, *Streptosporangium*). Les *Streptomyces* et apparentés ne synthétisent aucun glucide en quantité caractéristique (spectre C). Il en est de même chez les *Thermomonospora* et les *Thermoactinomyces*. La présence de xylose et d'arabinose (spectre D) est caractéristique des genres *Actinoplanes* et *Micromonospora*. C'est également selon le type de paroi que l'on peut séparer les genres les uns des autres et former des groupes dans la classification classique des actinomycètes. L'analyse des lipides est un autre élément qui, tout comme le type de paroi cellulaire, fournit des informations de valeur dans la classification et l'identification actinomycètes.

Outre leur paroi cellulaire caractéristique, les actinomycètes possèdent des structures cellulaires également uniques à ce groupe. En effet, le nombre de spores et la façon dont elles sont formées, la capacité des actinomycètes à produire des hyphes aériens ou non, la couleur des colonies et l'odeur dégagée par les espèces sur un milieu de culture donné, la morphologie et la couleur des mycéliums et des sporanges, les caractères de surface et la disposition des conidiospores, le pourcentage en G+C de l'ADN, les séquences de l'ARNr 16S, la composition phospholipidique des membranes cellulaires et la résistance des spores à la chaleur sont autant de tests simples à réaliser pour identifier sommairement quelques-unes de ces bactéries. (Lechevalier *et al.*, 1977 ; Minnikin *et al.*, 1977).



## 2. Classification des actinomycètes.

### 2.1. Les actinomycètes nocardioformes

Les nocardioformes développent un mycélium végétatif qui se fragmente facilement en bâtonnets et éléments coccoides. Plusieurs genres forment également un mycélium aérien qui se dresse sur le substrat et peut produire des conidies. Tous les genres ont un contenu élevé en G+C comme les autres actinomycètes et presque tous sont des aérobies stricts. Le genre *Nocardia* est répandu dans le sol du monde entier et également dans les milieux aquatiques. Les *Nocardia* peuvent dégrader des hydrocarbures et des cires et contribuer à la biodétérioration des joints de caoutchouc dans les conduites d'eau potable et d'eaux résiduaires (Prescott, 1993).

### 2.2. Les actinomycètes à sporanges multiloculaires

Les actinomycètes de la section 27 du *Bergey's Manual* forment des amas de spores lorsqu'un hyphes se divise transversalement et longitudinalement. Les sporanges ainsi formés sont dits multiloculaires c'est-à-dire qu'ils contiennent de nombreuses cellules ou compartiments. Les trois genres de cette section ont des parois de type III, bien que les compositions en sucres des extraits cellulaires différents. Le contenu en G+C varie de 57 à 75%. Il se développe en association symbiotique avec les racines d'au moins huit familles de plantes supérieures non légumineuses (ex : les aulnes) et c'est un microaérophile capable de fixer l'azote atmosphérique.

Les racines des plantes infectées développent des nodules qui fixent l'azote si efficacement qu'un aulne peut croître en absence d'azote combiné. Dans les cellules nodulaires, *Frankia* forme des hyphes ramifiés garnis de vésicules globulaires à leurs extrémités. Ces vésicules permettent la fixation de l'azote selon un processus ressemblant à celui de *Rhizobium* par sa sensibilité à l'oxygène et son exigence en molybdène et en cobalt (Prescott, 1993).

### 2.3. Les actinoplanes

Les actinoplanes (du grec *actinos*, rayon et *planes*, vagabond), possèdent un mycélium végétatif étendu et une paroi de type II D. normalement, ces organismes n'ont pas de mycélium aérien ou celui-ci est rudimentaire. Habituellement les conidiospores apparaissent dans un sporange dressé à la surface du substrat, à l'extrémité d'un hyphes spécial appelé un sporangiophore. Ces spores sont mobiles ou non.

Les actinoplanes se développent dans presque tous les biotopes du sol depuis la litière forestière jusqu'au sable des plages. Ils prospèrent également dans les eaux douces, particulièrement dans les ruisseaux et les rivières (probablement en raison de l'abondance en oxygène et en débris



végétaux). *Pilimelia* se multiplie là où il y a de la kératine. *Micromonospora* dégrade activement la chitine et la cellulose et il peut produire des antibiotiques comme la gentamicine (Prescott, 1993).

#### 2.4. Streptomyces et les genres apparentés

La section 29 de *Bergey's Manual* comporte quatre genres dont les représentants ont des hyphes aériens se divisant en un seul plan pour former des chaînes de 5 à 50 (au moins) conidiospores non mobiles dont la texture superficielle varie du lisse à l'épineux et au verruqueux. Tous possèdent une paroi de type I et un contenu en G+C variant de 69 à 78 moles%. Le mycélium végétatif lorsqu'il est présent, ne subit pas de fragmentation. On désigne souvent l'ensemble des membres de ce groupe sous le terme de streptomycètes (du grec *streptos*, courbé, tordu et *myces*, champignon).

Les streptomycètes sont très importants d'un point de vue écologique comme d'un point de vue médical. Le sol constitue le biotope naturel de la majorité de ces organismes, milieu dans lequel ils peuvent représenter 1 à 20% de la microflore cultivable. En fait, l'odeur de terre humide est en grande partie due à la production de substances volatiles, telles que la géosmine, par les streptomycètes. Ces micro-organismes jouent un rôle majeur dans la minéralisation. Ils sont très souples au niveau nutritionnel et ils peuvent dégrader, en aérobiose, des substances résistantes telles que la pectine, la lignine, la chitine, la kératine, le latex et des composés aromatiques. On connaît mieux les streptomycètes pour le grand nombre d'antibiotiques qu'ils synthétisent (Prescott, 1993).

#### 2.5. Les maduromycètes

Les maduromycètes rassemblent sept genres dans la section 30. Tous les genres ont une paroi du type III et du madurose, un dérivé glucidique : le 3-O-méthyl-D-galactose, dans des homogénats de cellules entières. Leur contenu en G+C varie de 64 à 74 moles %. Le mycélium aérien porte des paires ou de courtes chaînes de spores et le mycélium végétatif est ramifié. Certains genres forment des sporanges. (Prescott, 1993).

#### 2.6. Thermomonospora et les genres apparentés

Les quatre genres de la section 31 ont tous une paroi de type III et, habituellement, une composition en sucres de type C (*Thermomonospora* peut être de type III B). Leurs spores ne sont pas thermorésistantes. Ils présentent une variété considérable de morphologies et de modes de vie. *Thermomonospora* forme des spores uniques sur le mycélium aérien ou sur les mycéliums aérien et végétatif, et il peut se multiplier entre 40 et 48°C. Les hyphes aériens ont une forme en zigzag et sont prolongés par de longues chaînes de spores (Prescott, 1993).

## 2.7. Les thermoactinomycètes

Ce genre est thermophile et a une paroi de type III C., il se développe entre 45 et 60°C et il forme des spores uniques à la fois sur le mycélium aérien et sur le mycélium végétatif. Son contenu en G+C est inférieur à celui des autres actinomycètes (52 à 55 moles %) et la séquence de son ARNr 16S suggère une parenté avec le genre *Bacillus*. On le trouve fréquemment dans les tas de foin humide, les tas de compost et d'autres biotopes à température élevée. Contrairement aux autres spores d'actinomycètes, les spores de *Thermoactinomyces* sont de véritables endospores très thermorésistantes : elles peuvent survivre plus de 20 minutes à 100°C. Elles apparaissent dans les hyphes et semblent avoir une structure typique d'endospore contenant du calcium et de l'acide dipicolinique. (Prescott, 1993).

## 3. Cycle de développement des actinomycètes

Le cycle de développement débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes spores uninucléées (Flårdh et Bruttner, 2009) comme le montre la figure le montre

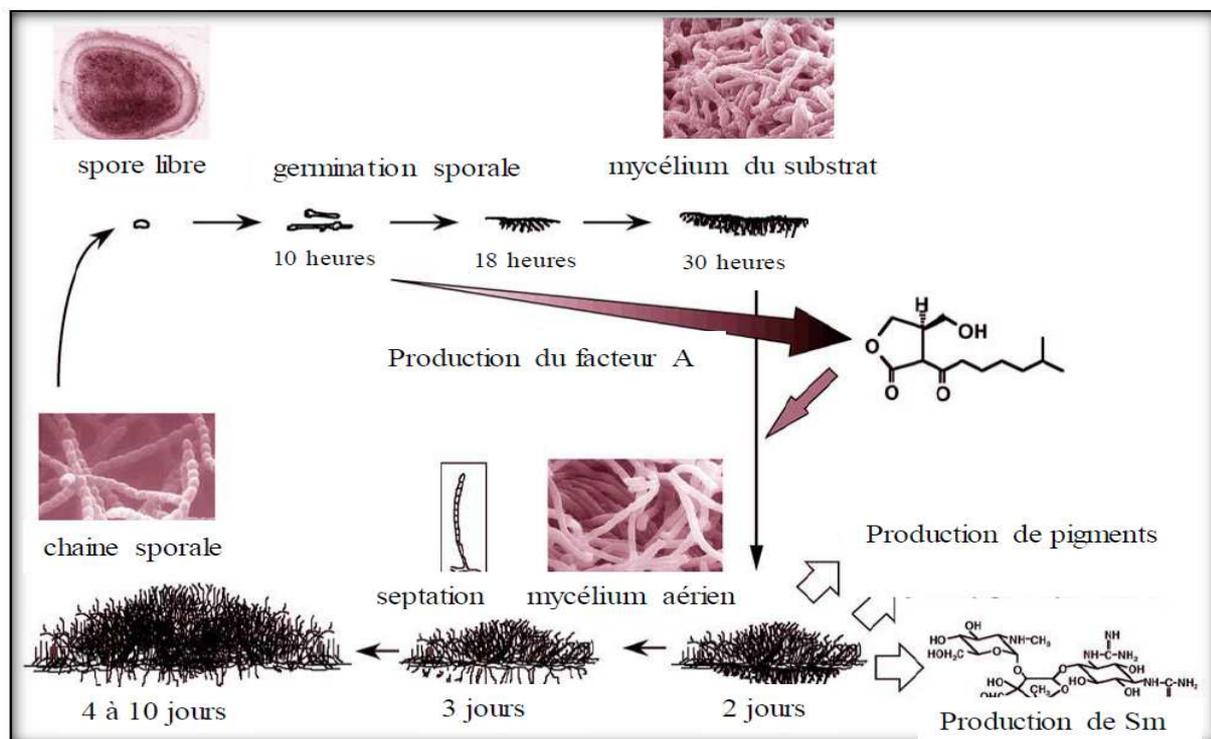


Figure 1 : Cycle de développement des Streptomyces sur milieu solide (Hopwood et al, 1985)



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

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

Les sporoactinomycètes produisent un véritable mycélium du substrat, ramifié et non fragmenté. Des parois transversales peuvent être formées pour isoler les parties les plus âgées du mycélium. Des spores sont formées sur le mycélium du substrat chez des genres comme :

*Micromonospora*, *Micropolyspora*, et parfois *Streptomyces* (Saffroy, 2006).

Le mycélium aérien, appelé aussi mycélium secondaire, est formé d'hyphes dressés sur le mycélium du substrat. Ces hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat ; ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe (Prescott *et al*, 2003).

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

Les divers types de spores des actinomycètes peuvent être classés en deux groupes principaux selon leur mode de formation : exospores et endospores (Theilleux, 1993). Ces spores permettent la propagation de l'espèce et la survie dans des conditions défavorables (Saffroy, 2006). Beaucoup d'actinomycètes qui forment des hyphes, produisent des exospores par sépation et fragmentation des hyphes ; ces spores sont dépourvues de structures spécialisées, mais font néanmoins preuve de résistance notamment vis-à-vis de la chaleur sèche, de la dessiccation, et de certains produits chimiques (Pelmont, 1994).

#### 6. Métabolismes sécrétés par les actinomycètes

##### 6.1. Molécules bioactives produites par les actinomycètes

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

**Tableau1** : Quelques antibiotiques produits par des actinomycètes non-streptomycète (El-Tarabilya et Sivasithampamb, 2006)



Producing species	Antibiotic	Reference
<i>Actinoplanes</i> sp.	Xanthone	Cooper et al. (1992)
<i>Actinoplanes</i> sp.	Sch 54445	Min et al. (1997)
<i>A. brasiliensis</i>	A/672	Palleroni (1989)
<i>A. caeruleus</i>	Heptaene	Palleroni (1989)
<i>A. deccanensis</i>	Lipiarmycin	Palleroni (1989)
<i>A. ferrugineus</i>	L-azetidine-2-carboxylic acid	Palleroni (1989)
<i>A. ianthinogenes</i>	Naphthoquinone	Palleroni (1989)
<i>A. missouriensis</i>	5-azacytidine	Palleroni (1989)
<i>A. philippinensis</i>	Macrocyclic lactone	Palleroni (1989)
<i>A. teichomyceticus</i>	Lipoglycopeptide complex	Carelli et al. (1995)
<i>A. utahensis</i>	Echinocandin	Boeck et al. (1989)
<i>Actinomadura madurae</i>	Simaomicin	Maiese et al. (1990)
<i>Actinomadura hibisca</i>	Pradimicin FA-1	Sawada et al. (1990)
<i>Microbispora</i> sp.	SCH 31828	Patel et al. (1988)
<i>Microbispora</i> sp.	Glucosylquestiomycin	Igarashi et al. (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Spartanamicins	Nair et al. (1992)
<i>Micromonospora</i> sp.	Rustmicin	Sigmund and Hirsch (1998)
<i>Micromonospora</i> sp.	Micromonosporin	Thawai et al. (2004)
<i>M. carbonacea</i>	Everninomicin	Kawamoto (1989)
<i>Micromonospora coerulea</i>	Glutarimide	BeomSeok et al. (1999)
<i>M. echinospora</i>	Gentamicin	Kawamoto (1989)
<i>M. echinospora</i>	Hazimicins	Marquez et al. (1983)
<i>M. halophytica</i>	Halomicin	Kawamoto (1989)
<i>M. inositola</i>	XK-41	Kawamoto (1989)
<i>M. olivasterospora</i>	Fortimicin	Kawamoto (1989)
<i>Microtetraspora</i>	SCH 42282	Hegde et al. (1998)
<i>Saccharothrix</i> sp.	Formamicin	Igarashi et al. (1997)
<i>Spirillospora</i> sp.	HM17	Hacene et al. (1994)
<i>Spirillospora</i> sp.	H107	Hacene et al. (2000)
<i>Streptosporangium albidum</i>	Aculeximycin	Ikemoto et al. (1983)
<i>Streptosporangium roseum</i>	AH7	Hacene et al. (1998)
<i>Streptoverticillium album</i>	Quinaldopeptin	Toda et al. (1990)
<i>Streptoverticillium cinnamomeum</i>	HA-94	Paradkar et al. (1998)

## 6.2. Utilisation des actinomycètes comme bio insecticides et bio pesticides

Les actinomycètes sont employés en agriculture comme des agents biologiques, qui peuvent être utilisés pour tuer les insectes nuisibles et les mauvaises herbes (Gadelhak et al, 2005)

## 6.3. Antifongiques

Les infections fongiques ont augmenté de façon dramatique durant les deux dernières décennies. Elles occupent le quatrième rang des infections nosocomiales (Yashuda, 2001 ; Beck Sagué et al, 1993). Ceci est essentiellement dû à l'augmentation du nombre des patients immunodéprimés,



comme les cancéreux, les personnes infectées par le virus de l'immunodéficience humaine (HIV), et les patients ayant subi une greffe d'organes solides (Yashuda, 2001). Près de 90% des mycoses humaines sont provoquées par des espèces appartenant aux genres *Candida* et *Aspergillus* dont les espèces *A. fumigatus*, *A. flavus*, et *A. niger* sont responsables de la majorité des mycoses invasives (Carle, 2003 ; Couturaud, 2004). La recherche de nouveaux antifongiques naturels a généré plusieurs centaines de molécules nouvelles. Cependant leur utilisation en thérapie humaine se limite surtout à l'amphotéricine B, à la nystatine, et à la griséofulvine (Cheraiti et al, 2012). La raison majeure réside dans la toxicité de ces molécules notamment les antifongiques polyéniques. C'est pourquoi l'industrie pharmaceutique et les chercheurs se sont orientés vers la recherche de nouveaux agents antifongiques plus performants et moins agressifs. Or les actinomycètes sont responsable de la production pour l'organisme. 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha et al, 2005)

## **7. Conditions influençant la production des molécules bioactives par les actinomycètes**

La composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires. Pour découvrir de nouveaux composés ayant une bioactivité prometteuse, plusieurs méthodes onéreuses, comme la recherche de nouveaux microorganismes producteurs par criblage de différentes sources biologiques particulières, ont été utilisées (Mellouli et al, 2003). Alternativement, une approche d'optimisation efficace des conditions de production de biomolécules à partir de la souche sélectionnée peut être réalisée à travers des études et des analyses des conditions physico-chimiques de la culture ainsi que la composition du milieu de croissance et de production.

### 7.1. Effet de la composition du milieu de culture

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En fait, les travaux de (Gesheva et al, 2005) ont montré que la nature des sources de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de trace éléments minéraux (essentiellement  $Mn^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$  et  $Fe^{2+}$ ), affectent



fortement la production de la molécule antifongique. De plus, (Mellouli *et al*, 2003) ont constaté que la production des biomolécules actives est étroitement liée à la nature de la source de carbone.

Outre l'importance de la nature de la source de carbone, plusieurs travaux ont montré l'implication d'autres nutriments dans la production de biomolécules par les microorganismes.

Pour la source d'azote, il a été rapporté que c'est la source d'azote inorganique (nitrate d'ammonium) qui donne la meilleure production de des antibiotiques (Sujatha *et al*, 2005).

Ces mêmes auteurs ont montré également l'importance de la nature de la source de phosphate dont certaines peuvent conduire à l'arrêt de la production de la biomolécule (Kishimoto *et al*, 1996 ; Sujatha *et al*, 2005)

L'importance du magnésium et du potassium dans la production des antibiotiques par différentes espèces a été rapportée par plusieurs chercheurs. (Mellouli *et al*, 2004), ont constaté que le meilleur rendement de production( Mellouli *et al*, 2004), ont constaté que le meilleur rendement de production de biomolécules de la nouvelle bactérie de *Streptomyces* TN58 est obtenu en présence de potassium à 2 mM.

Il est à noter que plusieurs autres additifs comme le sulfate, le chlorure, l'acétate et l'arginine peuvent influencer la production de plusieurs métabolites secondaires. C'est le cas des deux biomolécules, l'antibiotique IM-111-81 et de l'azalomycine B, dont la production par la souche *Streptomyces hygrosopicus* est stimulée par la présence de ces additifs (Gesheva *et al*, 2005).

## 7.2. Effet du pH, de la température

Les conditions de culture comme le pH, la température et le temps d'incubation affectant énormément la production des métabolites secondaires (Smaoui, 2010).

Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. Chez *Streptomyces aureofaciens*, le changement de pH pendant le procédé de fermentation peut induire des modifications de l'équilibre entre la production du chlorotétracycline et de la tétracycline dans le milieu de culture ; un pH acide favorise la production de chlorotétracycline et un pH basique favorise la sécrétion de tétracycline (Asanza-Ternuel *et al*, 1997).

Concernant la température, la souche *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 est variable d'une espèce à une autre. En effet, pour la souche de *Streptomyces* TN 58, la production de biomolécules commence après 60 heures



d'incubation pour atteindre un maximum après 72 heures. Elle reste stable jusqu'à 80 heures puis elle décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 heures (Mellouli et *al*, 2004).

L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Il a été rapporté par (Mellouli et *al*, 2004), que pour la souche de *Streptomyces* TN58, qui produit cinq molécules bioactives différentes, la meilleure production est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm. Pour des agitations faibles de l'ordre de 100 rpm ou fortes au voisinage de 300 rpm, la production de biomolécules chute énormément.

Chez les *Streptomyces*, l'évolution de la production des métabolites secondaires en fonction du temps, qui est un facteur déterminant, est variable d'une espèce à une autre. En effet, pour la souche de *Streptomyces* TN58, la production des biomolécules commence après 60 h

## II. Les antibiotiques

### 1. Définition

Un antibiotique est tout composé chimique, élaboré par un organisme vivant ou produit par synthèse, dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des micro-organismes (Singleton, 1994).

### 2. Classification des antibiotiques

La classification des antibiotiques peut se faire selon :

**Origine** : élaboré par un organisme (naturel) ou produit par synthèse (synthétique ou semi synthétique)

**Mode d'action** : paroi, membrane cytoplasmique, synthèse des protéines, synthèse des acides nucléiques.

**Modalité d'action** : Etudie les interactions dans le temps entre des concentrations variables d'un antibiotique et d'une bactérie.

**Spectre d'activité** : liste des espèces sur lesquelles les antibiotiques sont actifs (spectre étroit ou large)



**Nature chimique** : très variable, elle est basée souvent sur une structure de base (ex : cycle  $\beta$  lactame) sur laquelle il y a héli synthèse. La classification selon la nature chimique nous permet de classer les antibiotiques en familles ( $\beta$  lactamines, aminosides, tétracyclines.....etc.).

Dans ce qui suit, nous allons nous focaliser sur les antibiotiques produits par les actinomycètes

### 2.1. Antibiotiques inhibant la synthèse du peptidoglycane

De nombreux antibiotiques inhibent la synthèse du peptidoglycane, composant essentiel de la paroi des bactéries à Gram+ et à Gram-. On distingue trois classes principales de ces antibiotiques : les  $\beta$ -lactamines, les glycopéptides et la fosfomycine.

Exemple : Vancomycine produit par *Streptomyces orientalis* (McCormick et al., 1956).

Fosfomycine produite par *Streptomyces fradiae* et d'autres espèces de bactéries du genre *Streptomyces* (Hendlin et al., 1969).

### 2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Différentes classes d'antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes et de la synthèse des protéines bactérienne, et ce, au niveau de l'une des trois étapes principales de la traduction: l'initiation, l'élongation et la terminaison. Les antibiotiques de cette catégorie les plus importants en médecine sont les aminosides, les macrolides, les tétracyclines, les phénicolés et l'acide fusidique. La synthèse des protéines s'effectue dans le cytoplasme au niveau du ribosome bactérien. Il faut donc, pour toutes ces molécules, traverser le peptidoglycane et les diverses membranes pour arriver dans le cytoplasme et atteindre leur cible : le ribosome.

#### ➤ **Exemples :**

Erythromycine produite par *Saccharopolyspora erythraea* (Labeda, 1987).

Lincomycine produit par *Streptomyces lincolnensis* var. *lincolnensis* (Mason et al., 1962).

chloramphénicol élaboré par *Streptomyces venezuelae*, est maintenant produit par synthèse, et son dérivé le thiamphénicol.

### 2.3. Les aminoglycosides

Les aminosides ou aminoglycosides, plus correctement dénommés aminosides-aminocyclitolés (AMAC), sont des antibiotiques constitués par un ou plusieurs cycles glycosidiques liés à un aminocyclitol.

Exemples : streptomycine produit par *Streptomyces griseus*,



#### 2.4. Les tétracyclines

Les tétracyclines constituent une vaste famille inaugurée en 1948 ; ce sont des antibiotiques à large spectre, seulement bactériostatiques.

Exemples : Auréomycine élaborée par *Streptomyces aureofaciens*, (Duggar, 1948)

#### 2.5. Antibiotiques agissant au niveau de l'ARN polymérase

Bien que la rifampicine et ses dérivés soient les seuls inhibiteurs de l'ARN polymérase en usage clinique, de nombreuses molécules ont été décrites comme ciblant cette enzyme indispensable aux fonctions essentielles des bactéries. Les composés décrits à ce jour comprennent des produits naturels dont la plupart sont produits par des actinomycètes et, plus récemment, des molécules synthétiques.

Exemples :

Rifamycine produit par *Nocardia*

### **III. Résistance microbienne aux biomolécules**

La résistance des bactéries aux antibiotiques est connue depuis fort longtemps et son importance clinique est devenue très peu de temps après le début de l'antibiothérapie. Elle fait objet de publication et de revues de nombreuses qui rendent compte de sa constance évolution. Ses mécanismes sont mieux connus grâce aux progrès de la connaissance de la morphologie et du métabolisme bactérien.

#### **1. Résistance naturelle et résistance acquise**

##### 1.1. Résistance par mutation chromosomique

Ce phénomène spontané est rare et n'explique qu'une faible partie des résistances rencontrées en clinique. L'antibiotique n'induit pas la mutation mais si celle-ci survient l'antibiotique favorise la souche résistante qui est alors sélectionnée. La diffusion de ce type de résistance est liée à la diffusion de la souche mutante. Cependant, on peut rencontrer des cas où une seule mutation chromosomique aboutit à une élévation de résistance très importante ; par exemple, la CMI vis à vis de la streptomycine peut être multipliée par 1000 par une unique mutation chromosomique (Prescott, et al 2000).

##### 1.2. Résistance par acquisition de matériel génétique exogène

Ce type de résistance procède de l'acquisition de gènes de résistance par l'intermédiaire d'un plasmide ou de transposons à la faveur de 3 mécanismes d'échange possibles :



### 1.2.1. Conjugaison

Dans le phénomène de conjugaison, une bactérie donneuse transmet à une bactérie receveuse une copie de son matériel génétique porteur de gène de résistance (exemple : plasmides R ou facteur R). Les deux bactéries sont en contact étroit.

### 1.2.2. Transformation

La transformation est le l'introduction d'un ADN non enveloppé par une bactérie compétente et son insertion par recombinaison génétique dans le chromosome de cette bactérie. On peut alors obtenir de nouveaux gènes de résistance. Ce processus se fait généralement entre bactéries de genre proche car il doit y avoir une forte analogie entre les séquences nucléotidiques pour permettre la recombinaison.

### 1.2.3. Transduction

Dans la transduction, un virus bactériophage incorpore une séquence d'ADN d'une bactérie et la transmet à une autre bactérie. Du fait de la spécificité des bactériophages, ce phénomène n'a lieu que pour les bactéries de la même espèce.

## 3. Mécanismes biochimiques de la résistance aux antibiotiques

Les Bactéries ont développé plusieurs mécanismes de résistance aux antibiotiques :

### 3.1. Résistance par diminution de la pénétration ou paraugmentation de l'excrétion d'un antibiotique

Des protéines membranaires peuvent induire une augmentation de l'excrétion de l'antibiotique. On rencontre ce mécanisme chez certaines entérobactéries résistantes aux tétracyclines. La résistance s'explique par une concentration intracellulaire insuffisante de cette famille d'antibiotiques. Un mécanisme similaire est décrit pour les fluoroquinolones.

### 2.2. Résistance par modification de la cible

Une mutation peut induire une modification de la cible de l'antibiotique utilisé.

On retrouve ce phénomène pour de nombreuses familles d'antibiotiques : méticilline et nouvelles PLP (protéines de liaisons des pénicillines), macrolides et méthylation de l'ARN, rifampicines et mutation de l'ARN polymérase ADN-dépendante. Ce mécanisme de résistance est fréquent pour les quinolones : la bactérie résistante synthétise une ADN gyrase moins sensible.

### 2.3. Résistance par inactivation enzymatique de l'antibiotique



La synthèse de certaines enzymes peut réduire ou annuler l'efficacité d'un antibiotique. Ce mécanisme est décrit contre les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et le chloramphénicol. Dans le cas des  $\beta$ -lactamines, on peut distinguer des pénicillinases, ayant un support génétique essentiellement plasmidique et donc très répandues, et des céphalosporinases généralement chromosomiques et spécifiques d'espèces.

#### IV. Antifongiques

A l'exemple des bactéries qui deviennent résistantes aux antibiotiques, les champignons pathogènes pour l'homme (causant des mycoses) ainsi que les phytopathogènes développent des formes de résistances aux antifongiques et aux fongicides, respectivement.

Plusieurs familles thérapeutiques sont utilisables actuellement dans le traitement des mycoses à savoir : les polyènes (nystatine et amphotéricine B), les azolés (imidazolés et triazolés), etc. Les antifongiques agissent différemment selon leur famille chimique sur les organites cibles des champignons (Viguié, 2000) on distingue:

- ✓ Action sur la synthèse de la paroi fongique : polyoxines, nikkomycines, papulacandines.
- ✓ Action sur la membrane plasmique (polyènes, ciclopiroxolamine), ou l'ergostérol, constituant spécifique de la paroi des cellules fongiques (allylamines, azolés, terbinafine, thiocarbamate et amorphine).
- ✓ Blocage de la division cellulaire (griseofulvine).
- ✓ Inhibition de la synthèse des acides nucléiques (flucytosine).
- ✓ Inhibition de la chaîne respiratoire avec comme cible les mitochondries (ciclopiroxolamine).

En agriculture, les antifongiques (qu'on appelle aussi "fongicides") sont devenus une partie intégrale de production efficace. Plusieurs fongicides sont employés pour combattre des infections fongiques dans l'environnement mais ne sont pas utilisés en médecine en raison de leur toxicité. L'utilisation d'agents antifongiques de même classe chez l'homme et dans l'environnement pose des problèmes potentiels, particulièrement le développement de résistances. La résistance clinique d'*Aspergillus fumigatus* aux traitements par l'itraconazole, un des antifongiques les plus utilisés en médecine pour combattre les aspegilloses, augmente de plus en plus. *Aspergillus fumigatus* est aussi un organisme jouant un rôle important dans la dégradation de composants organiques. Il se répand dans l'environnement par la dispersion de spores de très petite taille. C'est l'espèce de champignon



causant le plus d'infections (que l'on nomme "aspergilloses") à l'échelle mondiale (Accoceberry et Noel , 2006).

Les mécanismes de résistance, mis en place par certaines souches de champignons, sont maintenant mieux connus, en particulier chez les levures du genre *Candida*. Dans la majorité des cas, ces mécanismes reposent soit sur des mutations qui ont pour effet de modifier la cible de l'antifongique ou d'en bloquer l'accès, soit sur la surexpression de gènes codant pour la cible ou pour des transporteurs membranaires impliqués dans un rejet actif de l'antifongique.

## V. Flavones et polyphénols

### 1. Flavones

Les flavones sont des composés phénoliques, contenant un groupe carbonyle. L'ajout d'une 3-hydroxy au groupe donne un flavonol (Fessenden et *al* ,1982 ). Les flavonoïdes sont également hydroxylés en substances phénoliques. Ils sont synthétisés par des plantes en réponse à une infection microbienne (Dixon et *al*, 1983.), mais aussi présents chez certains microorganismes.

Les flavones sont des substances antimicrobiennes efficaces contre une large gamme de microorganismes. Leur activité est probablement due à leur capacité de se complexer avec des protéines extracellulaires et avec la paroi cellulaire des bactéries. En plus, les flavonoïdes lipophiles peuvent également perturber les membranes microbiennes (Huang et *al* ,1995). Borris, et *al*,1996 ; Tsuchiya et *al*,1994 ; Vijaya et *al*, 1995).De nombreuses études ont démontré l'efficacité des flavonoïdes contre le VIH (Pengsuparp et *al* ,1995 ; Watanbe et *al*, 1995 ; Critchfield et *al*,1996) et contre le virus respiratoire syncytial (VRS) (Barnard et, *al* 1993 ; Kaul et *al*, 1985 ).

### 2. Phénols

Les catéchol et pyrogallol les deux sont des phénols hydroxylés, avérés toxiques pour les microorganismes. Catéchol a deux groupement OH, et le pyrogallol a trois sont pensés d'être liés de leur toxicité par rapport aux micro-organismes (Geissman et *al*,1963). En outre, certains auteurs ont constaté que plus les phénols sont oxydés plus leurs capacité antimicrobienne augmente (Scalbert,1991 ; Urs et *al*,1975 ). La toxicité phénolique est lié l'interaction non spécifiques plus avec les protéines de la membrane cellulaire (Mason et *al*, 1987).



## I. Souches tests

L'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes est testée sur des bactéries à Gram positif (*Bacillus subtilis*, *Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*), des bactéries à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* 27500, *Pseudomonas aeruginosa* A22, *E. coli* Cip et *E. coli* DH5α), des levures (*Candida albicans* et *Candida tropicalis*), et des champignons filamenteux (*Aspergillus niger*, *Penicillium chrysosum*, *Penicillium*, commun et *Penicillium expausum*, C').

## II. Isolats d'actinomycètes étudiés

Les isolats d'actinomycètes à tester pour la production de substances à activité antimicrobienne ont été isolés à partir du bois au niveau du laboratoire de biotechnologie microbienne par la doctorante Maataoui Hajar.

Ces isolats sont : H1, H2, H2', H3, H4, H5, H8, H9, H11, H12, H15 et H18.

## III. Activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes

### 1. Préparation de l'inoculum microbien

Les souches tests sont ensemencées au préalable dans un tube contenant 10ml du milieu LB liquide, et incubées à 37°C pendant une nuit, puis on étale chaque souche test sur milieu Muller Hinton, après avoir mesuré leur densité optique (voir annexe).

### 2. Choix du milieu optimum pour la production

La mise en évidence de l'activité antibactérienne a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar (Tortorano et al., 1979). Les souches d'actinomycètes sont ensemencées en stries serrées à la surface de 15 ml de milieux GYEA, Bennett, GLM, ISP, ISP2 (composition voir annexe). Après 7 jours d'incubation à 30°C, des cylindres de gélose sont prélevés à l'aide d'une pipette pasteur et déposés à la surface du milieu Muller Hinton (MH) pré-ensemencé avec les bactéries-tests. Placés deux heures à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives, les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 24 heures.

Après avoir mesuré les halos d'inhibition, un test Student a été effectué à l'aide du logiciel R.



### 3. Spectre d'activité des isolats d'actinomycètes

La mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinomycètes a été réalisée par la méthode des cylindres d'Agar. Le milieu de production choisit est le milieu ISP2.

### 4. Mise en évidence de l'activité antifongique

#### 4.1. Préparation de l'inoculum fongique

Les champignons filamenteux sont repiqués sur milieu Extrait de malt (composition voir annexe) et incubés à 30°C pendant 7 jours. Une suspension dense de spores et de fragments mycéliens est obtenue par raclage des cultures après addition du milieu ISP2. La suspension est centrifugée à 6000rpm pendant 20min et le surnageant contenant les spores est récupéré. Afin de vérifier la concentration des spores qui ne doit pas dépasser  $10^7$  spores/ml, 5 $\mu$ l du surnageant est déposé sur la lame de Malassez et le nombre des spores est calculée. (Hwang et al., 2001).

#### 4.2. Technique de la double couche.

5 $\mu$ l  $\mu$ l d'une culture liquide des isolats H1, H8 et H15 d'actinomycètes est déposé à la surface des boîtes de pétri contenant le milieu ISP2 puis les boîtes sont incubées pendant 7 jours à 30 °C ; la culture est ensuite recouverte par le milieu ISP2 faiblement gélosé (10 g/l)ensemencé par 100  $\mu$ l de la suspension de  $10^7$  spores/5 $\mu$ l de la souche-test. Les boîtes sont observées après 24 heures d'incubation à 37°C. Les zones d'inhibition sont mesurées. (Shomura et al., 1979)

## IV. Cinétique de la production des antibiotiques.

La cinétique de production d'antibiotiques a été déterminée pour les isolats H1, H8 et H15. Les pré-cultures des isolats d'actinomycètes ont été réalisées en erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml du milieu ISP2. Après une incubation de 48 h à 30 °C sous agitation constante à 250 tours par minute, les flacons ont été homogénéisés et 5 ml de chaque pré-culture a été utilisé pour inoculer un flacon de 500 ml contenant 100 ml de milieu ISP2. Les flacons ont ensuite été incubés dans les mêmes conditions que ci-dessus. Immédiatement après l'inoculation et à intervalles de 24 heures, des échantillons de 5 ml ont été prélevés, et centrifugés à 6000 rpm pendant 20 min. 100 $\mu$ l du surnageant est prélevé et déposé dans un puits de 6 mm de diamètre creusé dans sur un milieu gélosé MH préensemencé par la souche test (méthode des puits). Les boîtes sont placées à 4 °C



pendant 2 heures pour permettre une prédiffusion des substances bioactives, puis incubées à 37 °C pendant une nuit. (Boudjella et *al.*, 2006).

## V. Préparation de l'extrait organique des isolats H1, H8 et H15

Les isolats H1, H8 et H15 ont été soumis à une extraction par solvant organique en milieu liquide. Les isolats sont ensemencés dans un Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml du milieu ISP2 et incubés à 30°C sous agitation constante. Les cultures sont ensuite centrifugées à 6000 rpm pendant 20 min. Le surnageant obtenu est additionné de 100 ml d'acétate d'éthyle et le mélange est incubé sous agitation à température ambiante pendant deux heures. Après séparation des phases dans les ampoules à décanter, les fractions organiques obtenues pour chaque isolat sont concentrées par évaporation sous vide à l'aide d'une rotavapeur. Le résidu sec est ensuite repris dans 1 ml du méthanol ou de l'eau distillée (Zitouni et *al.*, 2005).

## VI. Etude physiologique et biochimique

### 1. Croissance en fonction du pH

Les isolats d'actinomycètes sont ensemencés en touches sur milieu ISP2 tamponné à différents pH (5-6-7-8-9 et 10) par des solutions de NaOH ou HCl (Crawford et *al.*, 1993). La croissance des isolats est évaluée visuellement après 5 à 7 jours d'incubation à 30°C.

### 2. Recherche des polyphénols et des flavonoïdes.

#### 2.1. Polyphénols (Singleton VL et *al.*, 1999)

Le contenu des composés phénoliques a été déterminé par la méthode de Folin ciocalteu (Singleton VL et *al.*, 1999). A 100 µl de l'extrait méthanolique de l'isolat, on ajoute 400 µl d'une solution de carbonates de sodium  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (75g/l) et 100 µl du réactif Folin; le mélange est agité puis incubé à 40°C pendant 5 minutes. L'apparition d'une coloration bleue foncée indique la présence des polyphénols dans l'extrait.

#### 2.2. Flavonoïdes (Karymi Y et *al.*, 2004)

A 5ml de l'extrait dilué à 5% de l'isolat d'actinomycète, on ajoute :

- 5ml de l'alcool chlorhydrique (éthanol, acide chlorhydrique, et eau distillé V/V/V)
- 1ml de l'alcool isoamylique.



Quelques coupes de zinc.

Le développement d'une coloration :



Rose-orangée indique la présence des flavones.



Rose-violacée indique la présence des flavonones .



La coloration rouge met en évidence la présence des flavanonols et des flavonols.

### 3. mélanoides

Les milieux ISP6 et ISP7 en gélose inclinée sont ensemencés en surface pour mettre en évidence les pigments mélanoides produits par les actinomycètes. Un tube non ensemencé sert de témoin. L'observation de la couleur brune noire caractéristique des pigments mélanoides se fait au 2<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> jour, en comparant les tubes ensemencés avec le témoin (Shirling et Gottlieb, 1966).

## VII. Recherche de l'activité des extraits organiques des isolats H1, H8 et H15 sur la paroi de *Staphylococcus aureus*.

Des extraits par acétate d'éthyle des isolats H1, H8 et H15 sont réalisés selon la méthode décrite ci-dessus (VII). Après évaporation l'extrait est repris dans 1ml d'eau distillée. 360µl de chaque extrait est additionné au culot bactérien obtenu après centrifugation de 1 ml d'une culture de nuit de *S. aureus* puis incubé à 37°C pendant de différents temps (5 min, 30 min et 1h). Ensuite, 40µl de NaCl 5M et 2 volume de l'éthanol absolu froid sont ajoutés ; l'ensemble est incubé à -20°C pendant 30 min. Le culot d'acides nucléiques est récupéré après centrifugation pendant 20 min à 12000rpm, lavé par l'éthanol à 70%, séché à l'air libre et récupéré dans 20µl d'eau distillée stérile.(H.Iraqiet *al.*,1991)

### 1. Electrophorèse sur gel d'agarose à 1 %

0,5 g d'agarose est ajouté à 50 ml de tampon TAE (composition voir annexe) ; l'ensemble est chauffé jusqu'à dissolution des grains d'agarose. Après refroidissement de la solution d'agarose, on y ajoute 0,2µl de bromure d'éthidium (0,5mg/l) puis le mélange est coulé dans une cuve d'électrophorèse contenant des peignes bien positionnés.

Après solidification du gel, 10 µl de la solution d'acide nucléique sont mélangés avec 2 µl d'une solution de charge (voir annexe), puis déposés au niveau des puits du gel. La migration



s'effectue sous un courant de 70 volts pendant environ 60 minutes. Le complexe acide nucléique-bromure d'éthidium est visualisé sous rayons UV.

## VIII. Chromatographie sur couche mince (CCM)

### 1. Principe

La CCM repose principalement sur des phénomènes d'absorption ; la phase mobile est un solvant ou un mélange de solvants, qui progresse le long d'une phase stationnaire fixée sur une plaque de verre ou sur une feuille en plastique ou en aluminium. Chaque composant de l'échantillon se déplace à sa propre vitesse derrière le front du solvant (Randerath, 1971 ; Vernin, 1970). Chaque tache détectée ou révélée est caractérisée par son rapport frontal donné par la relation suivante :

$$R_f = X/Y$$

**R<sub>f</sub>** : Rapport frontale.

**X** : Distance parcourue par le produit.

**Y** : Distance parcourue par le solvant

### 2. Mode opératoire

#### 2.1. Dépôt des échantillons

Une ligne de dépôt des extraits est tracée à environ 1cm du bord inférieur de la plaque, puis les extraits récupérés en méthanol des 3 isolats H1, H8 et H15 sont déposés sur la ligne de dépôt à l'aide d'une micropipette et séchés à l'air libre près d'une flamme.

#### 2.2. Saturation de la cuve

La phase mobile est versée dans la cuve de chromatographie (à une hauteur de 0,5cm), 15 minutes avant la migration.

Différentes phase mobiles sont testées :

1. (éthanol+ Amoniaque) 80:20 (V/V)
2. (methanol+ hexane )60:40 (V/V)



3. (chloroforme + méthanol) 90:10 (V/V)
4. (acétate d'éthyle+ méthanol) 70:30 (V/V)
5. (acetate d'éthyle + hexane) 30:70 (V/V)

### 2.3. Développement du chromatogramme

La plaque est placée en position verticale dans la cuve contenant le système de solvants, puis cette dernière est fermée et le solvant migre par capillarité vers le haut le long de la plaque. Lorsque le front de solvant se trouve à environ 1cm de l'extrémité supérieure de la plaque, cette dernière est retirée de la cuve et séchée à l'aide d'un séchoir.

### 2.4. Révélation

La plaque est observée sous lumière UV ; les produits qui absorbent les UV apparaissent sous forme de taches sombres. Les rapports frontaux ( $R_f$ ) sont calculés.

### 2.5. Criblage des fractions actives

#### 2.5.1. Bioautographie.

Cette étape a pour objectif de déterminer la fraction active par bioautographie dont le principe est le suivant : Les produits obtenus après la CCM sont coupés et chaque produit est déposé sur une boîte de pétri stérile. Ensuite, 5ml du milieu LB contenant 16g/l d'agarensemencé par *Staphylococcus aureus* est coulé sur les boîtes. Ces dernières sont incubées pendant une nuit à 37°C. L'activité antibactérienne est détectée par une zone d'inhibition autour du produit de silice.

#### 2.5.2. Grattage des produits de la CCM.

Les spots colorés sur la plaque de gel de silice, sont grattés et remis en suspension dans 2 ml d'acétate d'éthyle. Après centrifugation à 6000rpm pendant 10 min, le surnageant est récupéré puis évaporé ; le résidu est récupéré dans 100 µl d'eau distillée stérile et testé pour son effet antimicrobien comme suit : un disque de papier Whatman de 6 mm de diamètre est déposé sur une boîte de pétri contenant le milieu LB solide pré-ensemencé par la souche test. Ensuite, 5µl de l'extrait est déposé sur le disque jusqu'à atteindre un volume final de 20µl. après incubation pendant à 24 heures à 37°C, l'halo d'inhibition est évalué.

## **IX. Identification moléculaire de l'isolat H15**

### **1. Extraction de l'ADN de l'isolat H15**



A partir d'une culture fraîche de l'isolat H15 sur ISP2, une colonie est prélevée et dispersée dans un tube eppendorf contenant 50 µl d'eau distillée stérile. Le tube est ensuite incubé à -20°C pendant 30 min, puis chauffé à 95°C pendant 10 minutes. Cette opération est répétée 4 fois. Après centrifugation à 90000 rpm pendant 5 minutes, le surnageant est récupéré et utilisé pour la réaction d'amplification (PCR).

## 2. Amplification par PCR de l'ADNr 16S de l'isolat H15

### 2.1 Amorces utilisées

Les amorces utilisées sont des amorces universelles pour l'identification des bactéries :

FD1 : 5' AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3'

RS16 : 5' TACGGCTACCTTGTTACGACTT 3'

### 2.2 Réaction de PCR

Le mélange réactionnel est effectué comme suit :

**Tableau2** : Le mélange réactionnel de la PCR

Réactifs	Volume (µl)	Concentration finale
Tampon Taq (5X)	4	1 X
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1.2	1,5 mM
dNTPs (1 mM)	4	0,2 mM
FD1	2	1 µM
RS16	2	1 µM
Taq polymérase (5 U/µl)	0,2	0,05 U/µl
H <sub>2</sub> O bidistillée	4.6	-
ADN	2	-
Volume final	20	-

### 2.3 Amplification de l'ADNr 16S



Le mélange réactionnel est mis dans un thermocycleur. Le programme PCR utilisé est le suivant: dénaturation initiale (94°C pendant 5 min), suivie par 35 cycles de dénaturation (94°C pendant 30 s), alignement des amorces (55°C pendant 30 s) et l'extension (72°C pendant 1 min 30 s). Une extension finale à 72°C pendant 10 min a été réalisée.

Le produit d'amplification est analysé par électrophorèse sur gel d'agarose selon le protocole décrit ci-dessus (paragraphe IX).

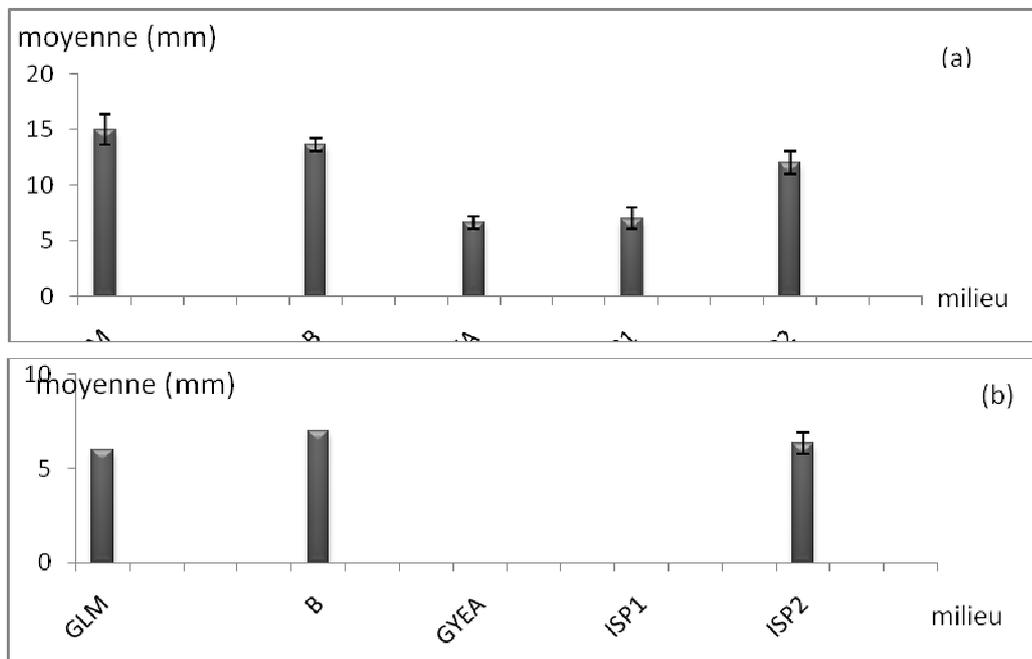
## 2.4 Séquençage

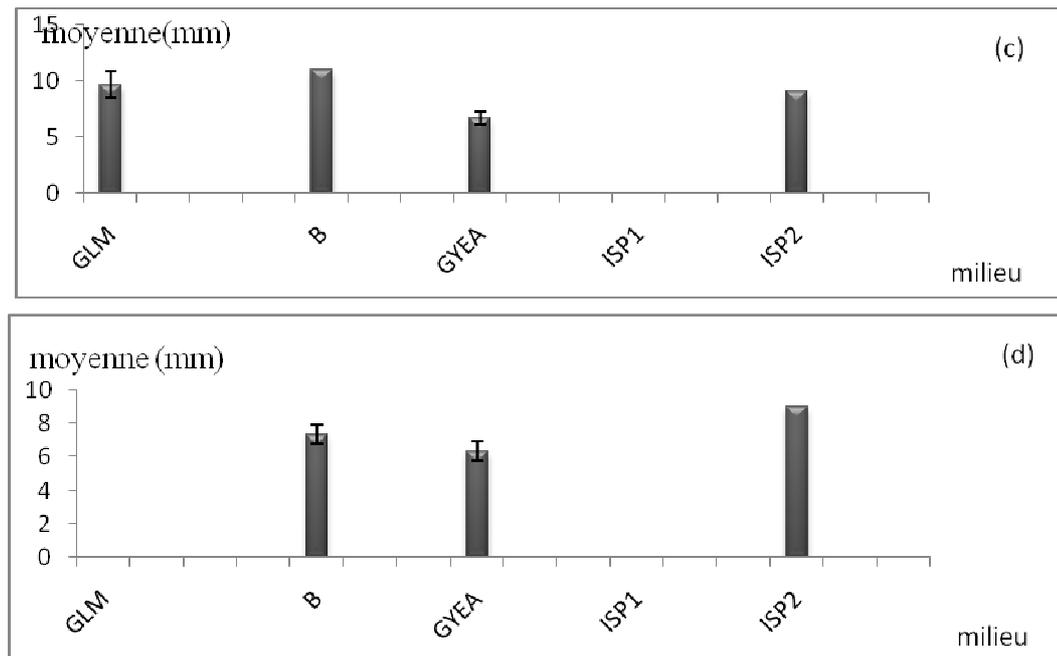
Séquençage est réalisé au Centre Universitaire Régional et d'Interface, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah – Fès. La comparaison de la séquence obtenue avec les banques de séquences (Genbank).

# I. Activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes

## 1. Test de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinomycètes en fonction du milieu de culture

L'activité de quatre isolats d'actinomycètes en fonction du milieu de culture a été évaluée contre la souche test *S. aureus*. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 2.





**Figure2** : Activité des isolats d'actinomycètes contre *Staphylococcus aureus* en fonction du milieu de culture : H1 (a), H8 (b) et H9 (c) et H18 (d)

Pour l'isolat H1, l'activité est manifestée dans les 5 milieux utilisés avec une production plus importante dans les milieux GLM, Bennett et ISP2.

Pour l'isolat H8, on constate que comme dans le cas de l'isolat H1, les meilleurs milieux de production sont GLM, Bennett et ISP2. Toutefois, il n'y a pas d'activité dans les milieux ISP1 et GYEA.

Pour l'isolat H9, on note que parmi les 5 milieux testés, ISP1 semble être un milieu inapproprié pour la production d'antibiotique par cet isolat.

Pour l'isolat H18, aucune activité n'est observée dans les milieux GLM et ISP1 à l'opposé des 3 autres milieux.

Les différences observées entre les diamètres d'inhibition de chaque isolat dans les différents milieux de production sont non significatives (test de Student).

Ces constats reflètent la variation des activités des souches d'actinomycètes d'un milieu de culture à un autre ; ce qui est bien établi pour les actinomycètes (Marshall et al., 1987; Kuster et Williams 1964 ; Tesic et lukic, 1966 ; Waksman, 1967 ; Singh et al., 2009) .

Le milieu ISP2 a été rapporté par plusieurs auteurs comme étant le meilleur milieu de production d'antibactériens (Aharonowitz et Demain ; 1978 ; Omura et Tanaka ; 1986 ; Sanchez et



Demain ; 1994). Pour cette raison, dans la suite de ce travail le milieu ISP2 a été utilisé comme milieu de production.

## 2. Spectre d'activité des isolats d'actinomycètes

L'activité antimicrobienne des différents isolats d'actinomycètes a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar et celle des stries croisées sur le milieu de culture ISP 2. Les résultats obtenus sont résumés dans le tableau3

**Tableau3** : Spectre d'activité des isolats d'actinomycètes (auréole d'inhibition en mm)

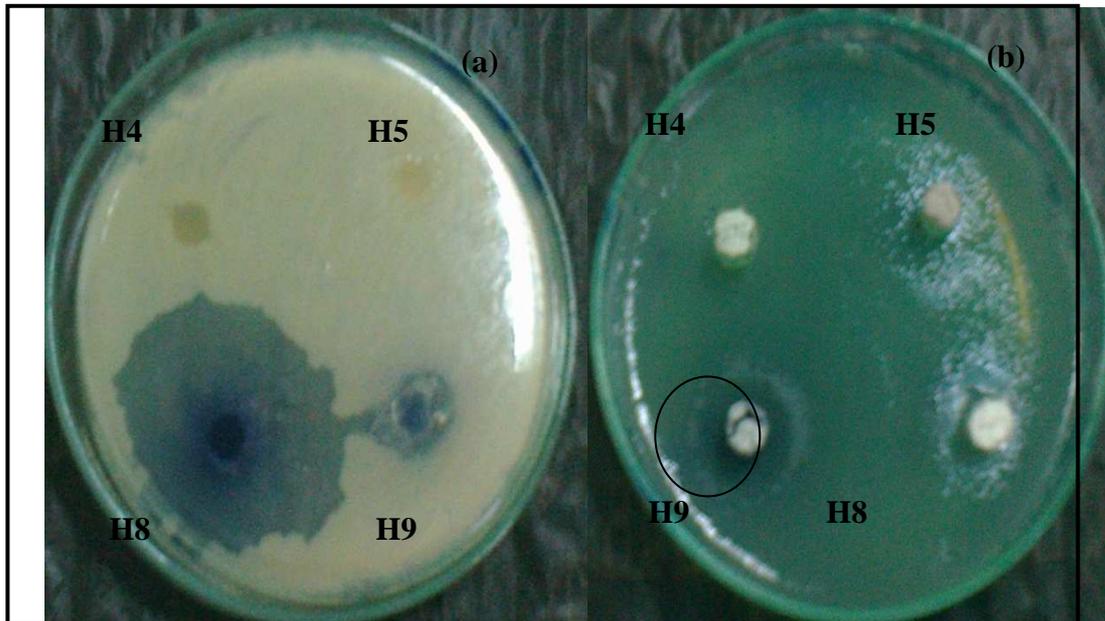
Souche test / Isolat	DH5 $\alpha$	cip	Ps	A22	Bc	Bs	Sa	Ct	Ca
H1	0	0	11	0	26,3	24,3	22,6	0	0
H2	0	0	10,3	0	27,3	22,6	2	0	0
H2'	0	0	10,3	0	7,5	7	9	0	0
H3	0	0	0	0	0	0	0	18	22
H4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H8	0	0	10	0	12	10,5	17	0	0
H9	0	0	11,6	0	31	30,3	26	0	0
H11	0	0	0	0	0	0	0	0	0
H12	0	0	0	0	2	18,6	19,3	0	0
H15	0	0	0	0	18	18,6	10,5	0	0
H18	0	0	0	0	11	18	15,6	0	0

Les résultats de ce criblage montrent que sur les 12 isolats testés, 9 sont actifs sur au moins sur un des microorganismes tests. Dans des études antérieures, il a été démontré que le taux d'isolement d'actinomycètes productrices d'antibiotiques est supérieure à 40 % (Lemriss et *al.*, 2003) et dans d'autres moins de 10 % (Jiang et XU, 1996).

Dans cette étude, le taux d'isolement d'actinomycètes à activité antimicrobienne est de 75 %. Les 4 isolats H8, H12, H15 et H18 produisent des substances antibactériennes contre les bactéries à Gram positif testées. Parmi les autres isolats doués d'activité antimicrobienne,

Les différences morphologiques entre les bactéries Gram-positives et Gram-négatives pourraient être responsables de leur différence de sensibilité. En effet, les bactéries Gram négatif ont une membrane extérieure constituée de polysaccharides, ce qui rend la paroi cellulaire imperméable aux composés lipophiles; contrairement aux bactéries Gram-positif, qui n'ont qu'une couche de peptidoglycane externe qui n'est pas une barrière de perméabilité efficace (Scherrer et *al.*, 1971). Par ailleurs, l'isolat H 3 possède un spectre d'activité très particulier car il agit seulement sur les deux espèces de *Candida* testées dans ce travail.

D'après les diamètres d'inhibition, Les bactéries à Gram positif testées semblent être les plus sensibles aux antibactériens produits par les actinomycètes étudiées.



**Figure 3** : Spectre d'activité des isolats d'actinomycètes, *B. subtilis*(a), *Ps 27500*(b)

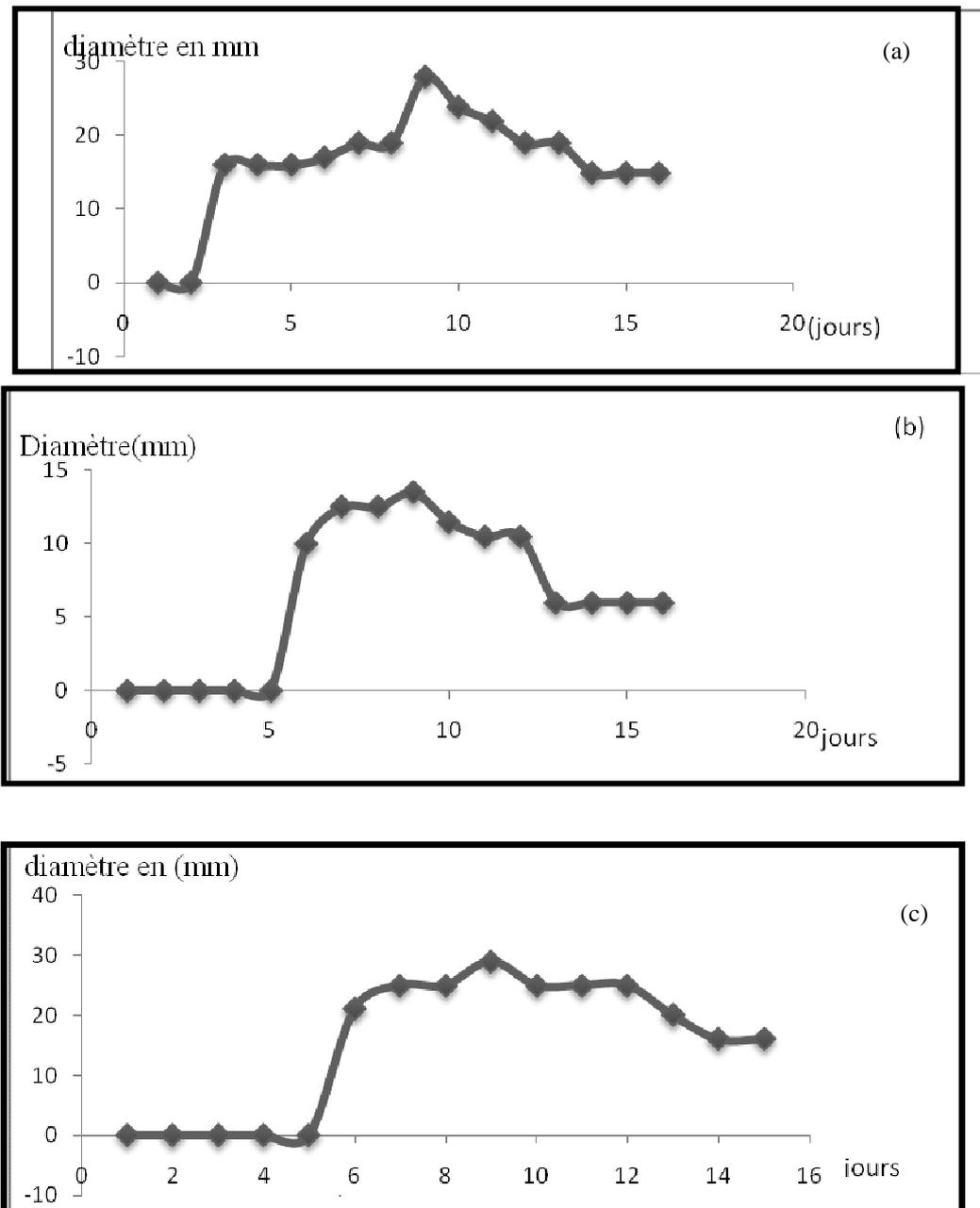
### 3. Activité antifongique des isolats d'actinomycètes

Le test de l'activité de 3 isolats d'actinomycètes contre différentes souches de champignons filamenteux isolées au laboratoire n'a montré aucune activité contre ces moisissures.

L'activité antifongique des 3 isolats devrait être testée contre d'autres champignons et sur différentes conditions de culture afin de mieux évaluer leur activité antifongique. En effet, il est bien établie que les conditions de culture influencent énormément la production d'antibiotiques par les actinomycètes. Par exemple, Cheraiti et *al.* (2012) ont montré que l'activité antifongique de certaines souches d'actinomycètes était plus importante dans le milieu GYEA par rapport aux milieux ISP1, ISP2 et Bennett. Ces résultats concordent avec ceux obtenus par Badji *et al.*, (2005) lors de leur étude sur l'activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. Toutefois, Boussaber et *al* (2012), ont trouvé que le milieu Bennett était le meilleur milieu de production d'antifongique puisque 86,2 % des actinomycètes étudiées présentaient une activité inhibitrice vis-à-vis d'au moins un des champignons testés sur ce milieu. Par ailleurs, Augustine (2005) ont montré que la production d'antifongique peut être stimulée ou inhibée par des variations de pH.

## II. Cinétique de la production des substances antibactériennes produites par 3 isolats d'actinomycètes

La cinétique de production des substances antibactériennes a été étudiée sur le milieu ISP2 liquide pour les isolats H1, H8 et H15 contre *Staphylococcus aureus*. Les résultats obtenus sont montrés dans la figure 4



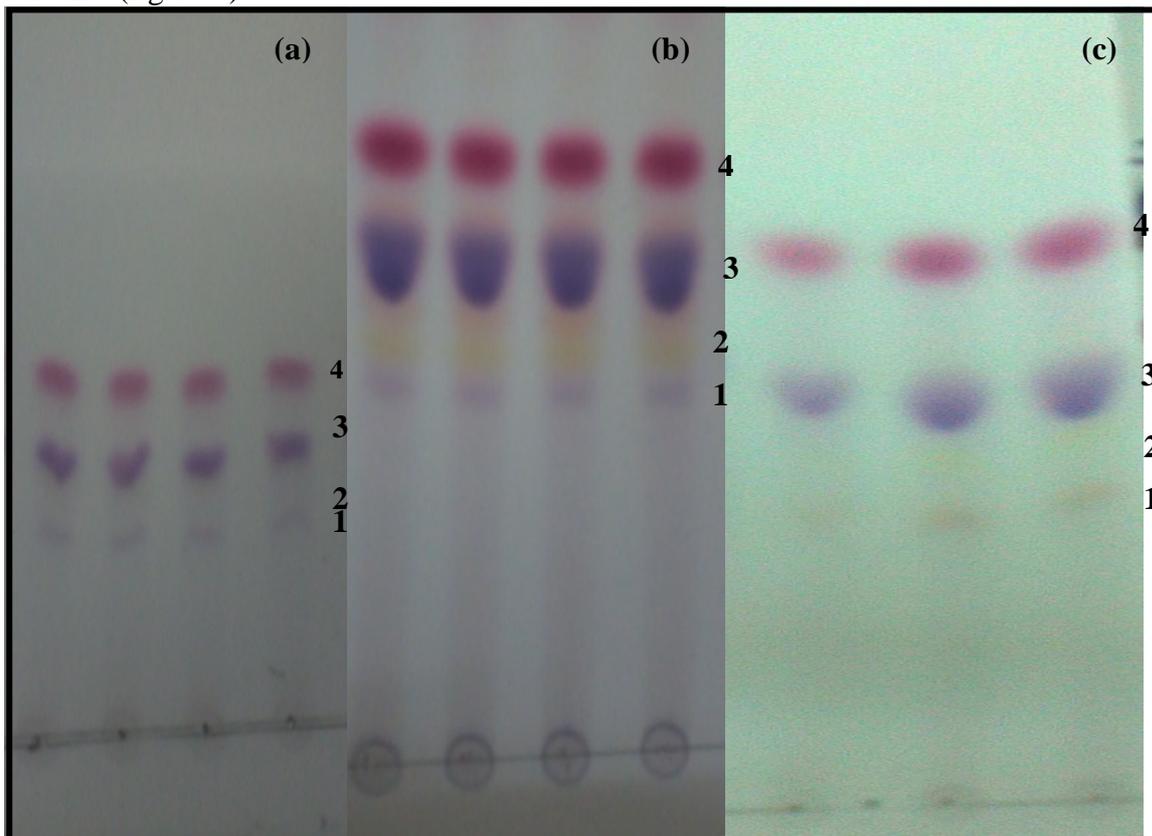
**Figure4** : Cinétiques de production des substances antimicrobiennes des isolats H1 (a), H8 (b) et H15 (c) contre *Staphylococcus aureus*



L'activité antibactérienne n'apparaît qu'après cinq jours d'incubation pour les isolats H8 et H15 et deux jours pour l'isolat H1. Elle augmente progressivement pour atteindre leur valeur maximale au 8<sup>ème</sup> jour. Ces résultats sont en accord avec la bibliographie qui montre que maximum de production des antibiotiques par les actinomycètes se fait entre 7 et 10 J. (Omura et Tanaka 1986). Reghiouaf et al. (2008) ont montré que l'activité antibactérienne contre les souches de *Bacillus cereus* et d'*Escherichia coli* apparaît après trois jours de fermentation, atteint son maximum vers le 9<sup>ème</sup> jour et reste constante jusqu'au 14<sup>ème</sup> jour. Les souches d'actinomycètes isolés par Zitouni et al. (2005) montre une activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* à partir du deuxième jour et une activité antifongique à partir du septième jour.

### III. Analyse par chromatographie sur couche mince (CCM) des extraits organiques de 3 isolats d'actinomycètes.

L'analyse par CCM des extraits organiques des isolats H1, H8 et H15 a montré les résultats suivants (figure 5).



**Figure 5 :** Analyse par CCM des extraits organiques des isolats H1 (a), H8 (b) et H15 (c). La phase mobile est un mélange de chloroforme / méthanol (9 / 1).

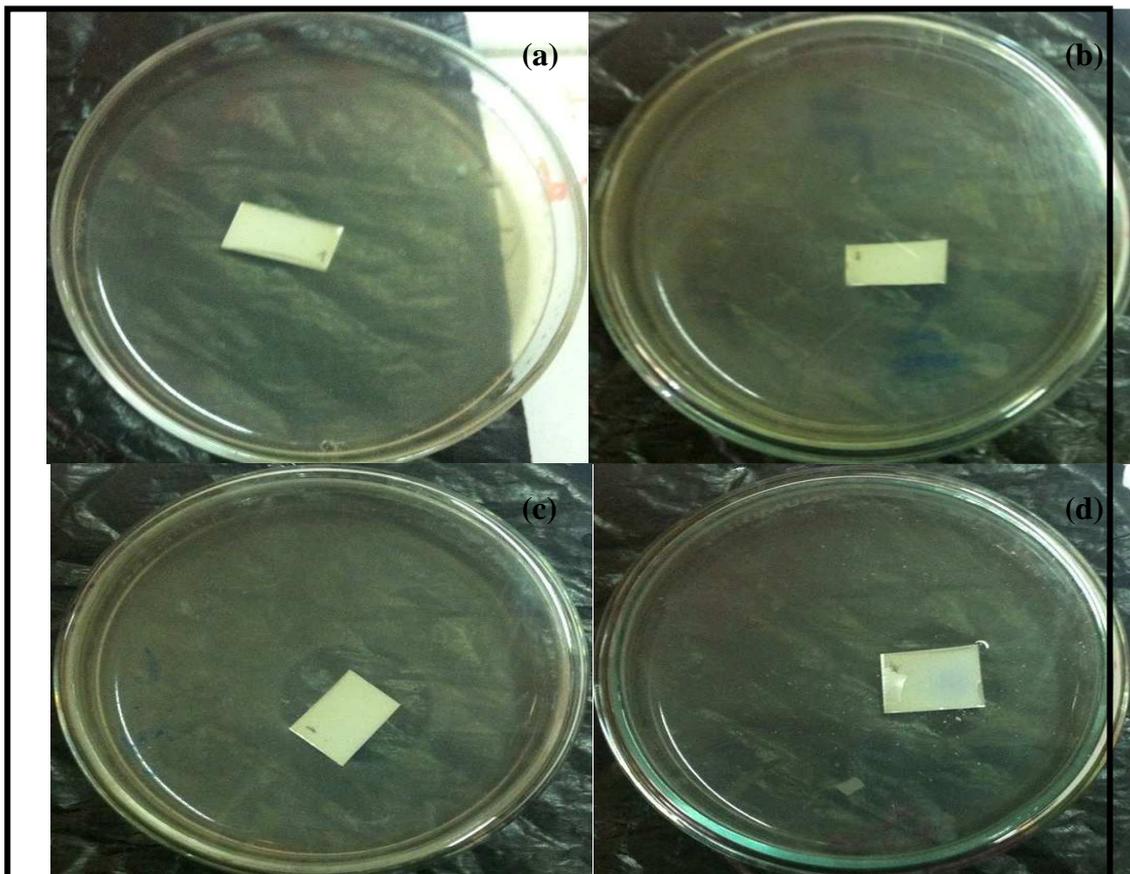
Les 3 extraits ont montré la présence de 4 produits de coloration différente ; les rapports frontaux (Rf) de ces produits sont montrés dans le tableau.

**Tableau 4:** Rapports frontaux des produits obtenues après CCM des extraits des isolats H1, H8 et H15.

Produit / Isolat	1	2	3	4
H1	0,38	0,49	0,66	0,82
H8	0,36	0,46	0,50	0,59
H15	0,41	0,47	0,52	0,67

Rf= distance parcourue par le soluté / distance parcourue par le solvant

Afin de détecter la ou les produit(s) responsable(s) de l'activité antimicrobienne contre *S. aureus*, nous avons effectué un test autobiographique, qui a montré une activité antimicrobienne au niveau des produits 3 et 4 pour les différents extraits (figure 6).





**Figure6** : Activité anti-staphylocoques des produits 1(a), 2(b) , 3(c) et 4(d) de la CCM de l'isolat H1.

Afin de confirmer ces résultats, les substances contenues dans chacun des 4 produits ont été testées séparément après élution de la silice contre *S. aureus*.

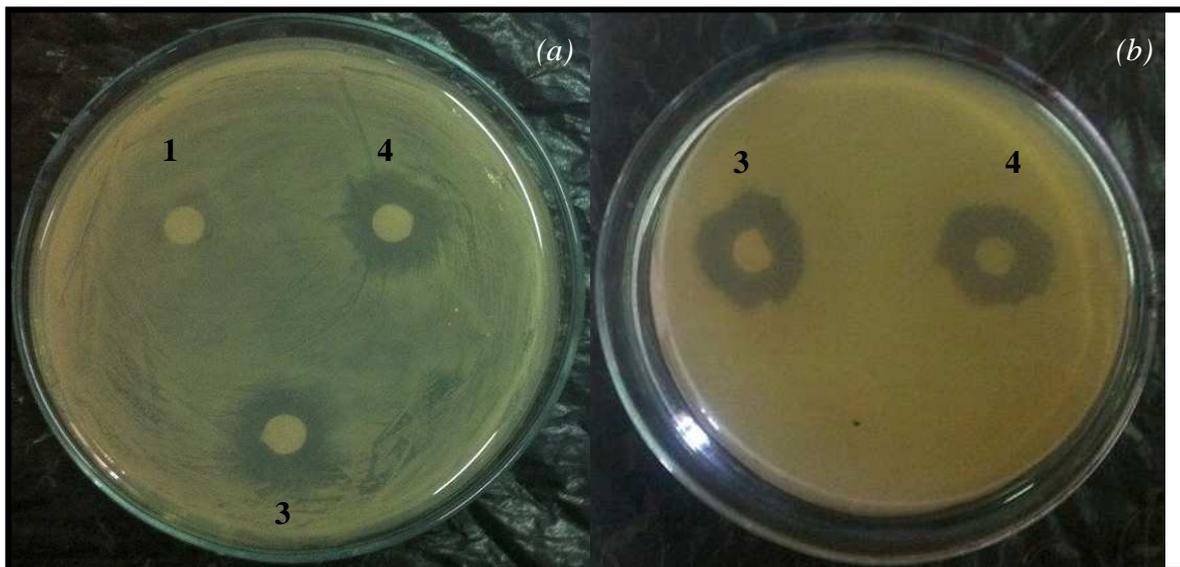
Les résultats de ce test confirment ceux obtenus par le test autobiographique (tableau). En effet, on remarque que seuls les extraits provenant du troisième et quatrième produit sont actifs sur *S. aureus*.

Les différents produits ont été aussi testés contre *B. subtilis* et *B.cereus*. On constate que l'extrait du premier et deuxième produit des isolats H1 et H15 ne montrent pas d'activité contre les 2 souches de *Bacillus*. Toutefois, l'extrait du deuxième produit de l'isolat H8 montre une activité contre ces 2 souches.

Ces résultats suggèrent que les isolats H1, H8 et H15 produisent différentes substances antibactériennes. Il serait intéressant de tester les extraits des différents produits sur un grand nombre de souches test afin de préciser le spectre d'activité de chacun des produits.

**Tableau5** : Test d'activité des extraits après élution des 4 produits obtenus après CCM des isolats H1, H8 et H15.

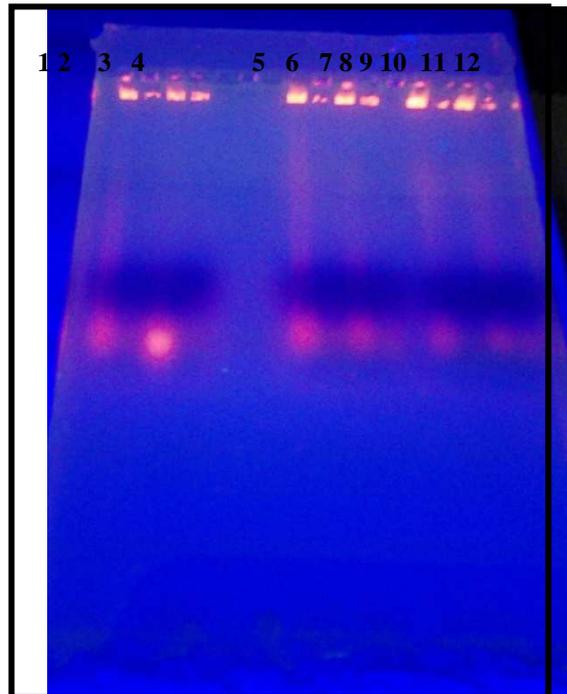
Isolate	produit	<i>S.aureus</i>	<i>B .subtilis</i>	<i>B.cereus</i>
H15	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	1,4	1,2	1,2
	4	1	1,1	1,4
H1	1	-	-	-
	2	-	-	-
	3	2,2	1,5	1,6
	4	2,4	1,2	1,8
H8	1	-	-	-
	2	-	1	0,7
	3	1,3	1,2	1,5
	4	1,6	1,3	1,7



**Figure7** : Test d'activité des extraits après élution des 3 produits obtenus sur CCM de l'isolat H15 contre *Sa* (a) et *Bs* (b)

#### IV. Recherche de l'activité des extraits organiques des isolats H1, H8 et H15 sur la paroi de *Staphylococcus aureus*

Les résultats de l'activité des extraits organiques des isolats H1 et H8 sur la paroi de *S. aureus* sont montrés dans la figure. On constate que les extraits des deux isolats permettent l'obtention de bandes d'ADN et d'ARN plus intenses que celles des témoins. L'intensité des bandes augmente avec le temps de contact des bactéries avec les extraits. Un résultat analogue a été obtenu avec l'extrait de l'isolat H15 (résultat non montré). Ceci pourrait être expliqué par l'action probable de ces extraits sur la paroi de *S. aureus*. Toutefois, ces résultats devraient être confirmés en diminuant le temps de contact des bactéries avec les extraits ou avec l'eau afin de vérifier si on pourrait obtenir une extraction d'acides nucléiques avec l'extrait organique et non dans le témoin. On pourrait aussi tester l'activité de ces extraits sur d'autres bactéries ou champignons.



**Figure 8** : Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % des acides nucléiques extrait de *S. aureus* par les extraits des isolats d'actinomycètes : puits1 : extrait de H1 pendant 5 min, : puits2 : témoin de l'extrait de H1 pendant 5 min , puits 3 : extrait de H1 pendant 30 min, : puits4 : témoin de l'extrait de H1 pendant 30 min ,puits 5 : extrait de H1 pendant 60 min, puits 6 :témoin de l'extrait de H1 pendant 30 min , puits7 : extrait H8 pendant 5 min, puits 8 : témoin de l'extrait de H8 pendant 5min ,puits 9 : extrait de H1 pendant 30 min, puits 10 :témoin de l'extrait H8 pendant 30min, puits 11 :l'extrait de H8 pendant 60min, puits 12 :témoin de l'extrait H8 pendant 60 min.

## V. Etude physiologique et biochimique des isolats d'actinomycètes

### 1. Croissance en fonction du pH

La croissance des différents isolats d'actinomycètes a été évaluée en fonction du pH du milieu de culture tableau6.

**Tableau6** : Effet du pH sur la croissance des isolats d'actinomycètes

pH Souche	5	6	7	8	9	10



H1	+	+	+	+	+	+
H2	+	+	+	+	+	+
H2'	-	+	+	+	+	+
H3	-	+	+	+	+	+
H4	-	++	++	++	+	+
H5	-	++	++	+	+	+
H8	-	++	++	+	+	+
H9	-	+	++	++	+	+
H11	-	+	++	++	+	+
H12	-	+	++	++	+	+
H15	-	+	+	+	+	+
H18	-	+	+	+	+	+

Les tests de croissance en fonction du pH ont été répétés 3 fois.

+ : Croissance moyenne

++ : Bonne croissance

En se basant sur ces résultats, les isolats d'actinomycètes peuvent être regroupés en deux groupes:

- Le premier groupe renferme les souches H2', H3, H4, H5, H9, H11, H12, H15 et H18 dont la croissance est observée pour des valeurs de pH allant de 6 jusqu'à 10.
- Le deuxième groupe regroupe les souches H1 et H2 qui ont en plus une capacité de pousser dans des valeurs de pH égale à 5.

On constate que les isolats H4, H5, H8, H9 et H11 et H12 ont tendance à mieux croître dans des pH voisins de la neutralité.

Ces résultats sont en concordance avec la bibliographie qui démontre que les actinomycètes poussent en général sur les milieux neutres (Kumar et al 2010). Toutefois, il existe des souches d'actinomycètes qui tolèrent des pH acides ou basiques. Certaines espèces peuvent avoir une croissance maximale dans des pH=5.5 et cette croissance diminue considérablement en se dirigeant vers les pH neutre (Swapnil et Desai 2010).

Il est important de noter que le pH du milieu peut aussi influencer la production des métabolites antibactériens et antifongiques (Basilio *et al.*, 2003). Il serait donc intéressant d'étudier l'effet du pH sur la production des substances antimicrobiennes par les isolats d'actinomycètes.

## 2. Production des flavonoïdes et des polyphénols

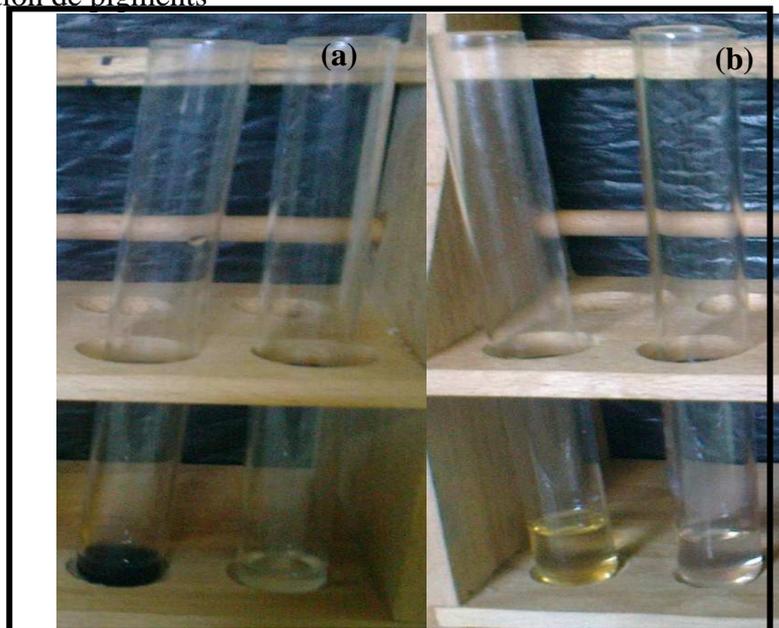
L'analyse de la production des flavonoïdes et des polyphénols par les isolats d'actinomycètes a montré les résultats suivants :

**Tableau7** : Production des flavonoïdes et des polyphénols par les isolats d'actinomycètes

Souche	Flavonoïdes	Polyphénols
H1	+	+
H2	+	+
H2'	+	+
H3	+	+
H8	+	+
H15	+	+
H18	+	+

+ : production de pigments

- : pas de production de pigments



**Figure 9**: Production des polyphénols(a) et flavonoïdes (b) par l'isolat H3

On constate que les isolats d'actinomycètes analysés produisent des flavonoïdes et des polyphénols. Nos résultats concordent avec ceux trouvés par Rajendra *et al.* (2003) qui ont mis en évidence la présence des flavonoïdes chez *streptomyces sp.* Les flavonoïdes et les polyphénols sont considérés comme étant des agents antioxydants (Stevens *et al.*, 2003), antimicrobiens et anticancéreux (Kofujita *et al.*, 2004). Ils peuvent montrer aussi une activité antivirale contre les virus d'influenza, HIV-1, HIV-2 et une activité antiallergiques.

### 3. La production des pigments mélanoides

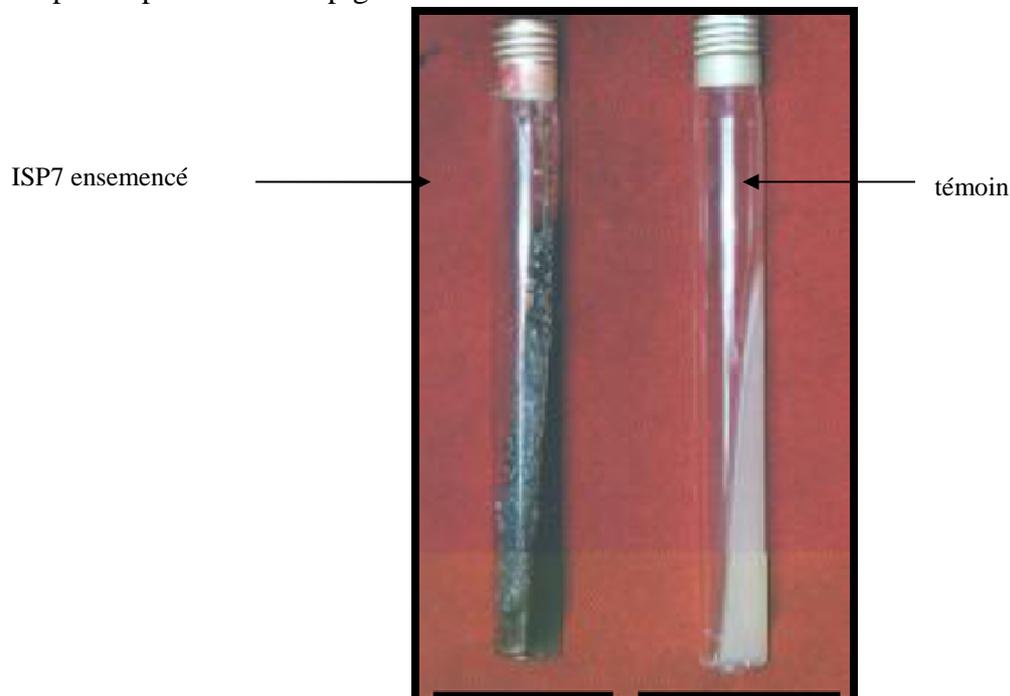
L'analyse de la production des pigments mélanoides par les isolats d'actinomycètes a montré les résultats suivants :

**Tableau8** : Production de pigments mélanoides par les isolats d'actinomycètes

Souche	ISP6	ISP7
H1	+	-
H2	+	+
H2'	-	-
H3	-	-
H4	-	-
H5	-	-
H8	-	-
H9	+	-
H11	+	-
H12	-	-
H15	-	-
H18	-	-

+ : production de pigments mélanoides

- : pas de production de pigments mélanoides



**Figure10** : Production des pigments mélanoides



Les isolats H2', H3, H4, H5, H8, H12, H15 et H18 ont donné des résultats négatifs sur les deux milieux ISP6 et ISP7 ; ce qui signifie que ces souches ne produisent pas des pigments mélanoides.

L'isolat H2 produit des pigments mélanoides caractérisés par la coloration brun noir sur les milieux ISP6 et ISP7. Cet isolat serait doté d'un système de phénolase. Il s'agit, dans ce cas, d'une tyrosinase puisque selon Margalith (1992), la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat. La tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénylalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation, le produit final est l'acide 5,6 dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur brun noir (Margalith 1992).

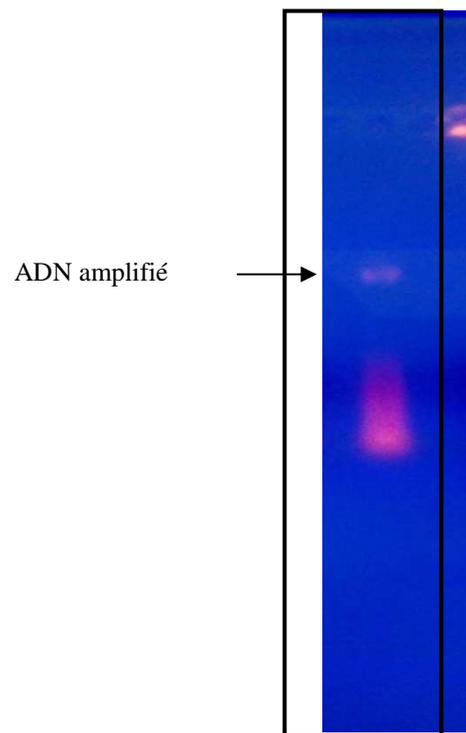
La production des pigments mélanoides est une caractéristique très importante pour les actinomycètes ; Shirling et Gottlieb (1972) l'ont considérée comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Par ailleurs, les pigments mélanoides peuvent être impliqués dans la virulence des souches comme il a été établi par Lindholm *et al.* (1997) qui ont rapporté que les souches de *Streptomyces scabies* isolées des lésions de lapatate ne sont pathogènes que si elles produisent des pigments mélanoides. Polak (1989) ont trouvé que les souches de *Cryptococcus neoformis* productrices de pigments mélanoides sont plus virulentes que les mutants albinos. Cette virulence est due à la mélanine présente dans la paroi de ce champignon, et qui agit comme une barrière contre les cellules immunitaires activées.

Les isolats H1, H9 et H11 produisent des pigments bruns sur le milieu ISP6 et non pas sur le milieu ISP7. Margalith (1992) et Mizukami *et al.* (2000) ont rapporté que les pigments bruns noirs produits par les actinomycètes dans le milieu ISP6 sans donner de résultat positif dans le milieu ISP7 ne sont pas de la mélanine, mais des pigments voisins de la mélanine. Par contre, Shirling et Gottlieb (1966) les considèrent comme des pigments mélanoides.

Identification moléculaire de l'isolat H15 :

## VI. Identification moléculaire de l'isolat H15 :

L'amplification par PCR de l'ADNr16S de l'isolat H15 en utilisant les amorces Fd1 et RS16 a donné le profil suivant après électrophorèse sur gel d'agarose (figure 11)



**Figure 11 :** Electrophorèse sur gel d'agarose 1 % des acides nucléiques amplifiés par PCR.

L'amplifiat a été soumis pour séquençage au Centre Universitaire Régional et d'Interface, Université Sidi Mohammed Ben Abdellah – Fès. La comparaison de la séquence obtenue avec les banques de séquences (Genbank) a montré que les homologies les plus importantes(85%) sont obtenues avec *Streptomyces sp.*

### *Conclusion et perspectives*

Au bilan, les résultats obtenus dans la présente étude montrent que sur les 12 isolats actinomycétales testées, 9 étaient actives envers au moins une bactérie-test. Une recherche du milieu de culture optimal de production a été réalisée sur les milieux ISP1, ISP2, GLM, Bennett et GYEA. Les tests statistiques ont montré une différence non significative entre les milieux GLM, Bennett et GYEA. Le test d'activité antimicrobienne des différents isolats a montré qu'ils ont des spectres différents contre les bactéries testées ; toutefois, aucun de nos isolats n'a montré une activité contre les champignons testés.



La croissance des 12 isolats en fonction du pH a montré une croissance dans un intervalle de pH allant du 6 jusqu'à 10, avec une croissance à un pH de 5 pour certains isolats.

Par ailleurs, les isolats H1, H2, H2', H3, H8, H15 et H18 ont la capacité de produire les pigments flavonoides et polyphénols.

Les extraits organiques des isolats H1, H8, et H15 étudiés ont été préparés et fractionnés par chromatographie sur couche mince (CCM). Ensuite, les bandes responsables de l'activité antimicrobienne ont été identifiées par bioautographie ; cette dernière montre que les deux bandes 1 et 4 contiennent une activité anti-*staphylocoques*. Un grattage du silice des spots obtenues après CCM a montré que pour les trois isolats les bandes 3 et 4 inhibent la croissance des souches *B. cereus*, *B. subtilis* et *s. aureus*. Pour l'isolat H8 nous avons constaté l'apparition d'une activité contre les souches *B. cereus* et *B. subtilis*.

Afin de déterminer le mode d'action des substances produites, nous avons étudié leur action sur la paroi de *S. aureus*. Les expériences réalisées suggèrent que les substances bioactives agiraient au niveau de la paroi de ces bactéries dans les cinq premières minutes de contact entre l'extrait et la souche test.

L'amplification par PCR et le séquençage de l'ADN r16S de l'isolat H15 a permis son assignation au genre *Streptomyces*.

Enfin, nous estimons que ce travail mérite d'être poursuivi afin de tester l'activité antifongique contre des champignons outre que ceux utilisés, et aussi optimiser les conditions qui permettent la production des molécules bioactives contre les champignons, ainsi qu'une détermination du spectre d'action des substances produites sur d'autres bactéries et en particulier sur des bactéries multirésistantes.

Il serait aussi intéressant d'identifier les autres isolats d'actinomycètes et de déterminer la nature chimique des substances antimicrobiennes produites et leurs modes d'action.



## Référence bibliographique

- Accoceberry I. and Noël T.** (2006) .Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie* 61 (3): 195-199
- Aharonowitz Y., Demain A.L** (1978) .Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*.*Antimicrobial Agents Chemotherapy*. 14:159-164
- Augustine SK.** (2005) Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J. Med. Res.*, 121: 164-170.
- Asanza-Teruel M. L., Gontier E., Bienaime C., Nava-Saucedo J. E. and Barbotin J. N.** (1997) Response surface analysis of chlortetracycline and tetracycline production with Kcarrageenan immobilized *Streptomyces aureofaciens*. *Enzyme Microb. Technol.* **21**: 314-320.
- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N** (2005) : Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine Saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*. pp: 1-9.3899-3905.



- Barnard, D. L., J. H. Huffman, L. R. Meyerson, and R. W. Sidwell.**(1993) Mode of inhibition of respiratory syncytial virus by a plant flavonoid. *Chemotherapy* 39:212–217.
- Basilio A., Gonzalez I., Vicente MF, Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A.** (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95:814-23.
- Borris, R. P.** (1990) Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company. *J. Ethnopharmacol.* 51:29–38.
- Basilio A., Gonzalez I., Vicente MF, Gorrochategui J., Cabello A., Gonzalez A.** (2003). Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J Appl Microbiol* 95:814-23.
- Bodner A.J., Kilkuskie R.E., Cheng Y.C., and Lee K.H.** (1990)Anti-AIDS agents. 2. Inhibitory effects of tannins on HIV reverse transcriptase and HIV replication in H9 lymphocyte cells. *J. Nat. Prod.* 53:587–595
- Boudjella H., Bouti K, Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N.** (2006) Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium Sg10* isolated from a Saharian soil. *Microbiol. Res.* 161: 288-298.
- Boussaber E., Kadmiri I.M., Hilali L., Hilali A.** (2012) Isolement des souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques Isolation of actinomycetes strains producing antifungal substances ScienceLib Editions Mersenne : Volume 4 , N ° 120801 ISSN 2111-4706.
- Brownlee, H. E., A. R. McEuen, J. Hedger, and I. M. Scott.** (1990) Antifungal effects of cocoa tannin on the witches' broom pathogen *Crinipellis pernicioso*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36:39–48.
- CARLE S.** (2003). Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel.*36 : 25-41
- Chun J, Blackall LL, Kang S, Hah YC, 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. and Ousley M.A.** (1993) Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol.* 59(11):



- Critchfield J.W ., Butera S. T., and Folks T. M.,** (1996) Inhibition of HIV activation in latently infected cells by flavonoid compounds. *AIDS Res. Hum. Retroviruses* 12:39.
- Dixon, R. A., P. M. Dey, and C. J. Lamb.** (1983). Phytoalexins: enzymology and molecular biology. *Adv. Enzymol.* 55:1–69. *N Y Acad Sci.* 51 : 177-181.
- Duggar BM** (1948) Aureomycin: a product of the continuing search for new antibiotics.
- El-Tarabilya KA.and Sivasithamparamb K** (2006) Non-streptomycete actinomycetes as biocontrol agents of soil-borne fungal plant pathogens and as plant growth promoters. *Soil Biology & Biochemistry.*; 38: 1505–1520.
- Ensign JC** (1978). Formation, properties and germination of actinomycetes spores. *Annu. Rev. Microbiol.* 32: 185-219.
- Fessenden, R. J., and J. S. Fessenden.**(1982) *Organic chemistry*, 2nd ed. Willard Grant Press, Boston, Mass.
- Flardh K, Bruttner M. J.***Streptomyces* morphogenetics: dissecting differentiation in a filamentous bacterium. *Nature Reviews.* 7: 36-49.
- Hendlin D, Stapley EO, Jackson M, Wallick H, Miller AK, Wolf FJ, Miller TW, Chalet L, Kahan FM, Foltz EL, Woodruff HB, Mata JM, Hernandez S, Mochales S** (1969) Phosphonomycin, a new antibiotic produced by strains of streptomyces. *Sci*166: 122-123.
- Hopwood DA, Bibb MJ, Chater KF, Kieser T, Bruton CJ, Kieser HM, Lydiate DJ, Smith CP, Ward JM., Schremph H** (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces: A Laboratory Manual.* Norwich, UK: John Innes Foundation
- Houssaini-Iraqi M., Lazraq R., Clavel-Sérès S., Rastogi N., David H.L.** (1991) Cloning and expression of *Mycobacterium aurum* carotenogenesis genes in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS microbiol lett.*90: 239-44.
- Huang, P. L., H. C. Chen, H. F. Kung, P. L. Huang, H. I. Huang, and S. Lee-Huang.** (1992). Anti-HIV plant proteins catalyze topological changes of DNA into inactive forms. *Biofactors* 4:37–41.
- Hwang B.K ., Lim S.W., Kim B.S., Lee J.Y., Moon S.S.**( 2001) Isolation In Vivo and In Vitro of Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidis*. *Applied and Environmental Microbiology.* 67: 3739-3745.



**Gadelhak, G. G. ; EL-TARABILY, Kh. A. and AL-Kaabi, F. K. (2005):** Insect control using chitinolytic soil actinomycetes as biocontrol agents. *Int. J. Agri. Biol.*, 7 (4): 627 – 633.

**Geissman, T.A.(1963)** Flavonoid compounds, tannins, lignins and related compounds, p. 265. *In* M. Florkin and E. H. Stotz (ed.), *Pyrrrole pigments, isoprenoid compounds and phenolicplant constituents*, vol. 9. Elsevier, New York, N.Y.

**Gesheva V., Ivanova V. and Gesheva R. (2005)** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by *Streptomyces hygrosopicus*. *Microbiol. Res.* **160**: 243-248.

**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.

**Karumi Y.,Onyeyili PA.,Ogugbuaja VO. (2004)** identification of active principes of *M.balsamina* (Balsam apple)leaf extarct .*J Med Sci* 4(3):179-182.

**Kaul, T.N., Middletown E., and .Ogra P. L. (1985)** Antiviral effect of flavonoids on human viruses. *J. Med. Virol.* 15:71–79.

**Kishimoto K., Park Y.S., Okabe M. and Akiyama S. (1996)** Effect of phosphate ion on mildiomycin production by *Streptoverticillium rimofaciens*. *J. Antibiotics.* **49**: 775-780.

**Kitouni M, Boudemagh A, Oulmi L, Reghiousa S, Boughachiche F, Zerizer H, Hamdiken H, Couble A, Mouniee D, Boulahrouf A, Boiron P. (2005)** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal of Medical Mycology.* 15: 45-51.

**Kofujita H., Yaguchi M., Doi N., Suzuki K., (2004).** A novel cytotoxic prenylated flavonoid from the root of *Morus alba*. *Journal of Insect Biotechnology and Sericology* 73, 113-116.

**Kumar SAURAV, K. KANNABIRAN (2010)** Diversity and Optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces VITSVK9* spp. isolated from Bay of Bengal, India *J Nat Env Sci* 2010 1(2):56-65.



- Kuster E, Williams ST** (1964). Selection of media for isolation of Streptomycetes. *Nature* 202: 928-929.
- Labeda DP** (1987) Transfer of the type strain of *Streptomyces erythraeus* (Waksman 1923) Waksman and Henrici 1984 to the genus *Saccharopolyspora* Lacey and Goodfellow 1975 as *Saccharopolyspora erythraea* sp. nov., and designation of a neotype strain for *Streptomyces erythraeus*. *Int. J. syst. Bacteriol.* 37: 19-22.
- Larpent JP, Sanglier JJ** (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson, Paris. 481.
- Lechevalier MP, De bievre C, Lechevalier HA** (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.* 5 : 249-260.
- Lechevalier HA, Lechevalier MP** (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In : The prokaryotes, Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds. Springer-Verlag, Berlin. p. 1915-1922
- Lemriss S., Laurent F., Couble A., Casoli E., Lancelin JM., Saintpierre-Bonaccio D., Rifai S., Fassouane A., Boiron P.** (2003) Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can. J. Microbiol.* 49: 669-74.
- Lindholm P., Kortemaa H., Kokkola M., Haahtela K., Salkinoja-Salonen M. and Valkonen J.P.T.** (1997) *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant. Dis.* 81, 1317-1322.
- Marshall V.P., McWethy S.J., Visser J., Cialdella J.I. Laborde A.L** (1987). Current fermentation technology for the production of antibiotics from actinomycetes: the example of paulomycin, *Developments in Industrial. Microbiology* 28, 105-114
- Margalith P. Z.** (1992) *Pigment microbiology.* Shapman & Hall. London. 5-114.
- Mason DJ, Dietz A, Deboer C** (1962). Lincomycin. A new antibiotic. I. Discovery and biological properties. In: *Antimicrobial agents and chemotherapy.* Antimicrob. Agts. Chemothe, p. 554.
- Mason, T. L., B. P. Wasserman.** (1987) Inactivation of red beet betaglucan synthase by native and oxidized phenolic compounds. *Phytochemistry* 26:2197–2202.
- McCormick MH, McGuire JM, Pittenger GE, Pittenger RC, Stark WM** (1956) "Vancomycin, A New Antibiotic. I. Chemical and Biologic Properties", *Antibiotics Annual.* 3: 606-611.
- Mellouli L., Karray-Rebai .I, Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili B, Bejar S.** (2004) Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology* 49(6): 400-406.



- Minnikin DE, Patel PV, Alshamaony L, Goodfellow M** (1977). Polar lipid composition in the classification of *Nocardia* and related bacteria. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 27: 104-107.
- Mizukami T., Masato Ikeda K. R., Miyake K. and Nakano T.** (2000) Mechanism of the incidental production of melanin-like pigment during 6-Demethylchlortetracycline production in *Streptomyces aureofaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 66 (4), 1400-1404.
- Nonaka, G.I., Nishioka I., Nishizawa M., Yamagishi T., Kashiwada Y., Dutschman G.E., Omura S. et Tanaka Y** (1986) Macrolide antibiotics, dans: Rehm H.J. et Reed J. *Biotechnology. Weinheim VCH Verlagsgesellschaft mbH*: 359-391.
- Pelmont J.** (2005). Biodégradation et Métabolisme. Les bactéries pour les technologies de l'environnement. EDP Sciences. France.
- Pengsuparp T., Cai L., Constant H., Fong H. H., Lin L. Z., Kinghorn A. D., J. M. Pezzuto., Cordell G. A., Ingolfsson K., and H. Wagner.** (1995) Mechanistic evaluation of new plant-derived compounds that inhibit HIV-1 reverse transcriptase. *J. Nat. Prod.* 58:1024–1031
- Polak G.** (1989) Melanin as a virulence factor in pathogenic fungi. *Mycoses.* 33, 215-224.
- Prescott, J.F.** (2000). Antimicrobial drug resistance and its epidemiology, in *Antimicrobial therapy in veterinary medicine*, J.F.B. Prescott, J. D.; Walker, R. D. Editor., Iowa State University Press. p. 27-49.
- Prescott L. M., Harley J.P., Klein D.A** (2003) *Microbiologie*. De Boeck & Larcier. France
- Prescott L., Harley J.P., Klein D.A** (2009). *Microbiologie*. 2ème édition, chapitre 25. 1993; 506-517.
- Saffroy S** (2006) Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat en Procédés biotechnologiques et alimentaires. Institut nationale polytechnique de Lorraine. France.
- Rajendra P., Maskeya., Ratnakar N. Asolkara, Michael Speitlinga, Volker Hoffmann., Iris Grün-Wollnyb, Werner F. Fleckc, and Hartmut Laatscha** (2002) Flavones and New Isoflavone Derivatives from Microorganisms: Isolation and Structure Elucidation
- Randerath K.** (1971). Chromatographie sur couches minces. Paris : édition Gauthier-Villars. 399p.
- REGHIOUAF S., BOUGHACHICHE., OULMI L., ZERIZER H., KITOUNI M., BOUDEMAGH A.** (2008) Séparation et caractérisation préliminaire d'antibiotiques produits par une souche représentative d'actinomycète isolés de sol aride de la région de Biskra *Sciences & Technologie C – N°28 Décembre* pp.59-64.



- Sanchez M., Valencia A., Ferrandiz M.J., Sander C. and Vicente M.** (1994) Correlation between the structure and biochemical activities of FtsA, an essential cell division protein of the actin family. *Embo J*, 13, 4919-25.
- SAURAV K., KANNABIRAN K.,** (2010) Diversity and Optimization of process parameters for the growth of *Streptomyces* VITSVK9 spp. isolated from Bay of Bengal, India *Journal of Natural & Environmental Sciences Is (2):56-65*.
- Scalbert A.** (1991) Antimicrobial properties of tannins. *Phytochemistry* 30: 3875–3883.
- Scherrer R., and Gerhardt, P.** (1971) Molecular sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast. *J Bacteriol*, 107, 718-35.
- Shirling EB., Gottlieb D.** (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int.J. Syst. Bact.* 16: 313-340.
- Shomura T., Yoshida J., Amano S., Kojima, M., Niida T.,**(1979). Studies on Actinomycetales producing antibiotics only in agar culture.1.Screening, taxonomy and morphologyproductivity relationship of *Streptomyces halstedii*, Strain SF-1993.*J .antibiot.*32, 427-435.
- Singh LS, Mazumder S, Bora TC** (2009). Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by salt- tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J. Med. Mycol.* 19: 225- 233.
- Singleton P** (1994).*Bactériologie*.Masson. France.
- Singleton VL.,Orthofor R.,Lamuela-Raventos RM.** (1999) Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidant by means of Follin Ciocalteu reagent,*Methods Enzymol* 299:152-178.
- Smaoui S.** 2010. Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 251p
- Stevens J.F., Miranda C.L., Frei B .,Buhler D.R.,** (2003) Inhibition of peroxynitrite mediated LDL oxidation by prenylated flavonoids: the alpha, beta-unsaturated keto functionality of 2'-hydroxychalcones as a novel antioxidant pharmacophore. *Chem Res Toxicol* 16, 1277-1286.
- Sujatha P., Bapi-Raju K. V. V. S. N. and Ramana T.** (2005) Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160: 119-126.



- SWAPNIL S., DESAI ATUL A.** (2010) Study of growth pattern of actinomycète species in various nutrient medium International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences Vol 2, Issue 4, ISSN- 0975-1491.
- Tesic Z, Lukic AM**(1966). Actinomyces coeruleus Baldacci, producer of an antibiotic of large antifungal spectrum. Mikrobiologija, 3: 183-193.
- Theilleux J., In Levreau J. Y., Bouix M. O.** 1993 Microbiologie industrielle, Les microorganismes d'intérêt industriel. TEC & DOC-Lavoisier. France. Ch 6 : 425-481.
- Tortorano A. M ., Cabrini E., Viviani M. A.** (1979) Sensibilité in vitro des levures à cinq antifongiques. Comparaison de deux methods C. M. I en gélose et method des disques. *Bull.Soc. Fr. Myc. Med.* 8: 69-74.
- Tsuchiya, H ., M. Sato, M. Iinuma, J. Yokoyama, M. Ohyama, T. Tanaka, I. Takase, and Namikawa I.** (1994) Inhibition of the growth of cariogenic bacteria in vitro by plantflavanones. *Experientia* 50:846–849.
- Urs N. V. R. R ., and Dunleavy J. M.,** (1975) Enhancement of the bactericidal activity of a peroxidase system by phenolic compounds (*Xanthomonas phaseoli* var. *sojensis*, soybeans). *Phytopathology* 65:686–690.
- Vernin G.** (1970). Chromatographie sur couche mince : techniques et applications en chimie organique. Paris: Dunod. 178p.
- Vigié C** (2000) .Médecine thérapeutique. 3, (3), *Thérapeutique*
- Vijaya K., Ananthan S ., Nalini R.** (1995) Antibacterial effect of theaflavin, polyphenon 60 (*Camellia sinensis*) and *Euphorbia hirta* on *Shigella* spp.—a cell culture study. *J.Ethnopharmacol.* 49:115–118.
- Waksman SA** (1967). The actinomycetes. Ronald Press, New York.
- Watanbe H., Miyaji C., Makino M., and Abo T.** (1996) Therapeutic effects of glycyrrhizin in mice infected with LP-BM5 murine retrovirus and mechanisms involved in the prevention of disease progression. *Biotherapy* 9:209– 220.
- Williams S.T. et Cross T** (1971) Actinomycetes, dans: Methods in microbiology. *Academic Press, London*: 295-334.
- Xu LH., Li Q., Jiang CL.** (1996) Diversity of soil actinomycetes in yunnan, China. *Appl. Environ. Microbiol.* 62: 244-248.



---

**Ya C., Gaffney S. H., Lilley T. H., and Haslam E.** (1988) Carbohydratepolyphenol complexation, p. 553. *In* R. W. Hemingway and J. J. Karchesy (ed.), Chemistry and significance of condensed tannins. Plenum Press, New York, N.Y.

**Yashuda JM.** (2001). An update on antifungal therapy: a focus on systemic agents for invasive fungal infections. J Health System Pharm, California. pp: 4-12.

**Zitouni A., Boudjella H., Lamari L., Badji B., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N.** (2005) *Nocardiosis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Research in Microbiology. 156: 984-993.