

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE  
SCIENTIFIQUE  
UNIVERSITÉ SAAD DAHLAB BLIDA  
FACULTÉ DES SCIENCES AGRO-VÉTÉRINAIRES ET BIOLOGIQUES  
**DEPARTEMENT DE BIOLOGIE**



Mémoire de fin d'étude en vue de l'obtention du diplôme

*De Master en Biologie*

*Option : Microbiologie/Bactériologie*

## *Thème*

**Production d'antibiotiques par la souche BA4 de  
*Streptomyces* en fonction des sources d'azotes**

**Présenté par :**

**Mlle ALIOUAT Sihem**

**Soutenu le :**

**19/12/2013.**

**Devant un jury composé de :**

<b>-Mme KEBBAS S.</b>	<b>MAA</b>	<b>USDB</b>	<b>Présidente</b>
<b>-Mme MEKLAT A.</b>	<b>MCB</b>	<b>USDB</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>-Mme MERROUCHE R.</b>	<b>MCB</b>	<b>ENS de Kouba, Alger</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>-Mme LAMARI L.</b>	<b>MCA</b>	<b>ENS de Kouba, Alger</b>	<b>Promotrice</b>

**Promotion  
2012-2013**

## **REMERCIEMENTS**

Tout d'abord, je remercie Dieu, le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas.

Je tiens à adresser ma profonde reconnaissance à Madame Lynda LAMARI, Maître de conférences, et Directrice de mémoire, pour m'avoir accordé sa confiance pour mener à bien ce projet, pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques, de sa sympathie, sa simplicité et sa convivialité. Qu'elle trouve ici le témoignage de ma profonde gratitude.

Un immense merci à Monsieur le Professeur Nasserine SABAOU pour m'avoir permis de réaliser ce travail au sein du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure d'Alger (LBSM-ENS-Kouba).

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements à Mme KEBBAS S. qui m'a fait l'honneur de présider mon jury.

J'exprime également mes vifs remerciements à Mme MEKLAT A. et Mme MERROUCHE R. d'avoir accepté d'évaluer ce travail.

J'exprime également mes vifs remerciements à Monsieur BOUTOUMI du département de biochimie à l'université Saad-Dahleb.

Je souhaite également remercier Monsieur BADIS du département de biochimie à l'université Saad-Dahleb, pour m'avoir recommandé l'ENS afin d'y réaliser mon mémoire.

...et merci à tous les étudiants stagiaires avec qui j'ai eu le plaisir de faire un bout de chemin. Je les remercie tous pour leur enthousiasme et leur travail.

## **DEDICACES**

**Je dédie ce travail :**

**A mes très chers parents à qui je dois toutes mes réussites.**

**A mes très chers frères et sœurs.**

**A Lyes, qui a toujours cru en mes capacités et m'a tant soutenu et aidé durant tous les moments difficiles.**

**A mes très chères grand-parents.**

**A mes oncles, en particulier mes oncle Salah et Ahmed KARA.**

**A mes tantes, mes cousins et mes amis.**

**A ma très chère copine Hadjer REDOUANE SALAH et sa famille.**

**A ma copine Amina.**

**Je dédie ce travail à tous mes amis de promotion de Microbiologie pour leurs bonnes humeurs et leur joie de vivre, je les remercie de m'avoir agréablement accueilli au sein de leur groupe.**

**Enfin, à mes collègues du Enfin, à mes collègues du journal « EL-IKTISADI » à KOUBA, en particulier Mr Mohamed Salah HERZELLAH et Yacine DJENADI. Je les remercie pour leur compréhension et encouragement.**

## RESUME

La recherche de nouveaux genres et espèces d'actinomycètes actifs contre les bactéries multirésistantes pathogènes pour l'homme et causant des infections nosocomiales est nécessaire. A ce titre, Les chercheurs s'évertuent à sélectionner des souches actives à partir d'environnements particuliers ou extrêmes (les sols sahariens). C'est dans ce cadre que nous avons entrepris nos investigations de recherche.

L'étude est menée sur une souche d'actinomycètes BA4 isolée de la palmeraie de Béni-Abbès, additionnée de streptomycine sur milieu Chitine-vitamines B. Son activité antagoniste a été évaluée sur milieu complexe ISP2 par la technique des stries croisées contre plusieurs microorganismes pathogènes pour l'homme que ce soit à Gram positif ou négatif notamment les bactéries multirésistantes responsables d'infections nosocomiales. Notre souche a montré des propriétés antibiotiques intéressantes contre ces microorganismes ainsi qu'un développement important est noté sur le milieu de culture utilisé.

Des cinétiques (production d'antibiotiques, croissance et pH) ont été effectuées en milieu synthétique avec amidon. Les résultats obtenus ont montré que le taux de production des antibiotiques peut être considérablement influencé par la nature de la source d'azote ajoutée au milieu de culture.

Les antibiotiques produits ont été extraits par divers solvants organiques et d'après les résultats d'antibiographie contre des germes-cibles, le n-butanol a été déterminé comme meilleur solvant d'extraction.

**Mots clés :** Actinomycètes, souche BA4, bactéries multirésistantes, activité antagoniste, cinétiques, antibiotiques.

## SAMMARY

The research of new genera and species of actinomycetes against multi-drug resistant pathogens to humans and causing nosocomial infections is necessary. As such, researchers strive to select active strains from specific or extreme environments (Saharan soils). It is in this framework that we began our research investigations.

The study is conducted on a strain of actinomycete BA4 with streptomycin on medium chitin-vitamin B, isolated from the palm Grove of Beni-Abbes. Its antagonist activity was assessed on complex media ISP2 by the technique of cross-streaks against several pathogenic microorganisms to humans either Gram positive or negative including the multidrug-resistant bacteria of nosocomial infections. Our strain showed interesting activity against these microorganisms antibiotic properties as well as an important development is noted on the culture media used.

Kinetics (production of antibiotics, growth and pH) were performed in synthetic medium with starch. The results showed that the rate of production of antibiotics can be significantly influenced by the nature of the nitrogen source added to the culture medium.

Produced antibiotics were extracted by various organic solvents and based on the results of antibiography against target germs, n-butanol was determined as the best solvent for extraction.

**Key words :** Actinomycètes, strain BA4, multidrug-resistant bacteria, antagonist activity, kinetics, antibiotic.

## ملخص

البحث عن أصناف وعينات جديدة من Actinomycètes النشطة ضد البكتيريا المتعددة المقاومة، المضرة بالإنسان والمسببة للأمراض الاستشفائية امر ضروري، وعلى هذا النحو، يسعى الباحثون لتحديد السلالات النشطة من بيئات محددة او متطرفة (الانزبة الصحراوية). وفي هذا الإطار بدانا بحوثنا.

تجري الدراسة على سلالة Actinomycètes تم عزلها من بساتين النخيل ببني عباس في الوسط كيتين فيتامين ب مضاف اليه ستربتومييسين. ولقد تم تقييم نشاطها على هذه الوسط المركب ISP2 مضاف اليه النشا، بتقنية الأشرطة المتقطعة ضد كائنات مجهرية متعددة سواء كانت موجبة او سالبة الغرام، بما في ذلك، البكتيريا المتعددة المقاومة المسببة للأمراض الاستشفائية. ومن الملاحظ لدينا ان السلالة أظهرت خصائص تضادية حيوية هامة ضد هذه الكائنات المجهرية، فضلا عن نمو هام في وسط الاستنبات المستخدم.

حركية انتاج المضادات الحيوية، النمو ودرجة الحموضة أجريت في الوسط السائل الاصطناعي مع النشا. النتائج المتحصل عليها اظهرت ان حركية انتاج المضادات الحيوية تتأثر مباشرة بطبيعة منبع عنصر الازوت في وسط تكاثرها.

المضادات الحيوية المنتجة تم استخلاصها بواسطة مذيبات عضوية مختلفة واستنادا الى نتائج Antibio-graphie ضد الجراثيم المستهدفة، n-butanol صنف كأفضل مذيب للاستخلاص.

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا هيفية، سلالة BA4 ،البكتيريا المتعددة المقاومة، الأنشطة التضادية،حركية،المضادات الحيوية.

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1** : Clés d'identification pariétale des principaux genres d'Actinomycètes.
- Figure 2** : cycle de développement des streptomycètes sur milieu solide.
- Figure 3** : Schéma illustrant la technique des stries croisées.
- Figure 4** : Méthode des puits de diffusion.
- Figure 5** : Culture prélevée après centrifugation à 5000 rpm.
- Figure 6** : Schéma général d'extraction, et de révélations des activités antibiotiques.
- Figure 7** : Méthode des disques en papier.
- Figure 8** : Préparation des plaques du gel de silice et chromatographie.
- Figure 9** : Protocole général de production et d'extraction des antibiotiques.
- Figure 10** : Activité antibactérienne de la souche BA4 par la méthode des stries croisées.
- Figure 11** : Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche BA4 par la méthode des puits de diffusion sur milieu ISP2.
- Figure 12** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en MS (ajouté de l'asparagine).
- Figure 13** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en MS (ajouté de la DL-alanine).
- Figure 14** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en MS (ajouté de la tryptonine).
- Figure 15** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS (ajouté de l'extrait de levure).
- Figure 16** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS (ajouté du nitrate de calcium).
- Figure 17** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en MS (ajouté du sulfate d'ammonium).
- Figure 18** : Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en MS (ajouté du nitrate d'ammonium).
- Figure 19** : Antibiographie des extraits organiques de la souche BA4.

**Figure 20** : Activités des extraits organiques de la souche BA4 de *Streptomyces* sp sur *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923).

**Figure 21** : Activités des extraits organiques de la souche BA4 de *Streptomyces* sp sur *Acinetobacter* sp (CLM).

**Figure 22** : Activités des extraits organiques de la souche BA4 de *Streptomyces* sp sur *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

**Figure 23** : Localisation des activités antibiotiques des extraits organiques des filtrats de cultures de la souche BA4 par bioautographie.

## **LISTE DES TABLEAUX**

**Tableau 1 :** Classification de quelques antibiotiques selon leur spectre d'action.

**Tableau 2 :** Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique.

**Tableau 3 :** Principales familles d'antibiotiques et cibles cellulaires.

**Tableau 4 :** Résultats de la méthode des stries croisées obtenus sur le milieu de culture ISP2 pour la souche BA4.

**Tableau 5 :** Résultats des antibiographies des extraits organiques de la souche BA4.

## LISTE DES ABREVIATIONS

**Ala** : DL-alanine

**Asn** : Asparagine

**ATCC** : Americain Type Culture  
Collection

**BA** : Beni-Abbès

**Bs** : *Bacillus subtilis*

**CCM** : Chromatographie sur couche  
mince

**CH-V** : Chitine-Vitamine B

**CLM** : Collection de Laboratoire de  
Microbiologie

**E.A.E** : Ethanol-ammoniaque-Eau

**Ec** : *Escherichia coli*

**E.N.S** : Ecole Normale supérieure

**Ext** : Extrait de levure

**GC** : Guanine-Cytosine

**Kp** : *Klebsiella pneumoniae*

**MA** : Mycelium aerien

**MH** : Muller-Hinton

**MS** : Milieu synthétique

**MSS** : Milieu Semi'Synthétique

**N.Ca** : Nitrate de Calcium

**N.NH3** : Nitrate d'ammonium

**Ps** : *Pseudomonas aeruginosa*

**Rf** : Rapport frontal

**rpm** : rotation par minute

**S** : Streptomyces

**Sa** : *Staphylococcus aureus*

**Trp** : Tryptone

**UV** : Ultra Violet

# SOMMAIRE

## INTRODUCTION

## REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Les Actinomycétales .....	1
1. Définition .....	1
2. Ecologie et Distribution dans l'environnement .....	1
3. Distribution dans les sols Sahariens d'Algérie .....	2
4. Importance des Actinomycètes .....	2
4.1. Intérêt dans ans les domaines médical, industriel et biotechnologique .....	2
4.2. Intérêt dans le domaine agronomique et vétérinaire .....	3
4.3. En pathologie .....	3
5. Taxonomie .....	3
5.1. Critères actuels d'identification des genres .....	4
5.1.1. Critères morphologiques.....	4
5.1.1.1. Caractères macromorphologiques (ou cultureux) .....	4
5.1.1.2. Caractères micro morphologiques .....	4
5.1.2. Critères chimiques .....	6
5.1.2.1. Acide diaminopimélique et autres acides aminés .....	6
5.1.2.2. Glucides cellulaires .....	6
5.1.2.3. Lipides membranaires et pariétaux .....	6
5.2. Clé d'identification des genres .....	7
6. Le genre <i>Streptomyces</i> .....	10
6.1. Position taxonomique .....	10
6.2. Cycle de développement .....	10
II. Les Antibiotiques .....	12
1. Définition .....	12
2. Classification des antibiotiques .....	12
2.1. Classification d'après le spectre d'action .....	12
2.2. Classification d'après la structure chimique .....	12
2.3. Classification d'après leur type d'action .....	14
2.4. Classification d'après leur mode d'action .....	14

2.5. Classification d'après la charge électrique .....	14
3. Mode d'action des antibiotiques .....	14
4. Microorganismes producteurs d'antibiotiques .....	15
4.1. Les bactéries non mycéliennes et les champignons .....	15
4.2. Les actinomycètes .....	16
5. Résistance bactérienne aux antibiotiques .....	16
6. Les microorganismes résistants aux antibiotiques .....	17
6.1. Microorganismes résistants à Gram positif .....	17
6.1.1. <i>Staphylococcus aureus</i> .....	17
6.1.2. <i>Streptococcus pneumoniae</i> .....	17
6.1.3. Les entérocoques .....	17
6.2. Microorganismes résistants à Gram négatif .....	17
6.2.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	17
6.2.2. <i>Acinetobacter baumannii</i> .....	18
6.2.3. La famille des <i>Enterobacteriaceae</i> .....	18
6.2.3.1. Le genre <i>Salmonella</i> .....	18
6.2.3.2. <i>Escherichia coli</i> .....	18
6.2.3.3. <i>Klebsiella pneumoniae</i> .....	18
7. Biosynthèse et Optimisation de la production d'antibiotiques .....	19
8. Influence de la composition du milieu de culture sur la production d'antibiotiques .....	20
8.1. Influence de la source de carbone .....	20
8.2. Influence de la source d'azote .....	20

## **REVUE EXPERIMENTALE**

<b>I. LA SOUCHE BA4 DE STREPTOMYCES SP</b> .....	22
1. Origine de la souche .....	22
2. Conservation de la souche .....	22
<b>II. RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOUCHE BA4 SUR MILIEU SOLIDE</b>	
1. Les microorganismes-cibles .....	22
2. Milieu de culture .....	22
3. Technique des stries croisées .....	22

### **III. CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES EN MILIEUX LIQUIDES**

1. Le milieu synthétique .....	24
2. Les sources d'azote .....	24
3. Obtention des pré-cultures .....	24
4. Ensemencement de la souche BA4 en fioles d'Erlenmeyer .....	25
5. Suivi de la production d'antibiotiques : Méthode des puits de diffusion .....	25
6. Mesure de la biomasse et du PH .....	27
7. Mesure de la biomasse .....	27

### **IV. EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIOGRAMME**

1.Extraction à partir des filtrats de culture .....	27
2.Extraction à partir du mycélium .....	29
3. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits par antibiographie .....	29
4. Méthode de diffusion des disques de papier .....	29

### **V. LA MISE EN EVIDENCE DES ANTIBIOTIQUES PAR BIOAUTOGRAPHIE**

1. Préparation des plaques du gel de silice .....	30
2. Dépôt des échantillons et développement des plaques .....	30
3. Révélation microbiologique ou bio-autographie .....	33

<b>RESULTATS ET DISCUSSIONS</b> .....	34-53
---------------------------------------	-------

### **CONCLUSION**

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNEXES**

## INTRODUCTION GENERALE

Au cours de ces dernières décennies, le monde de la santé a été marqué par une augmentation inquiétante de nombre de bactéries pathogènes multirésistantes et par l'émergence de nouveaux agents pathogènes en particulier, encore plus dans les pays en voie de développement ( Boughachiche *et al.*, 2005 ). Ceci a même parfois à un blocage thérapeutique ( Katsumi *et al.*, 2003 ; Sekhsokh *et al.*, 2008 ) des traitements des infections respiratoires, digestives et urinaires, et des infections de la peau et des tissus mous, ainsi que de certaines maladies sexuellement transmissibles et de méningites ( O.M.S., 2003).

Dans les milieux hospitaliers, la résistance des bactéries aux antibiotiques pose un problème majeur de la santé publique (Soussy, 2007). En Algérie, plusieurs travaux publiés ont signalé l'apparition de nouvelles souches résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés, dont certains sont des molécules très récentes (3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> génération d'antibiotiques) (Touati, 2006 ; Aggoune-Khinache *et al.*, 2008 ; Messai, 2008) .

La dissémination des bactéries multirésistantes présente une nouvelle menace grave qui met en cause la validité de l'arsenal antibiotique actuellement disponible (Mkaouar *et al.*, 2008). Actuellement plusieurs stratégies dans le monde ont été entreprises dont celles qui reposent sur la recherche systémiques de nouveaux antibiotiques à partir d'organisme (Yang, 2008). L'exploration des ressources naturelles peu ou pas étudiées ou celles soumises à des conditions environnementales extrêmes, sont un choix souvent privilégié (Eldridge *et al.*, 2002 ; Gathogo *et al.*, 2004 ; Badji 2006). Les microorganismes constituent la principale source naturelle d'antibiotiques (Lezzarini *et al.*, 2000) et aussi des composés anti-tumoraux ; antiviraux, antiparasitaires, etc. Environ 23000 métabolites secondaires bioactifs produits par des microorganismes ont été rapportés et seulement 150 d'entre eux sont en utilisation dans la pharmacologie, l'agriculture ou d'autres domaines.

Parmi ces microorganismes, les actinomycètes sont particulièrement utiles dans l'industrie pharmaceutique pour leur très grande capacité à produire des métabolites secondaires avec des structures chimiques diversifiés (Valan Arasu *et al.*, 2008). Ils sont universellement répandus et peuvent coloniser divers milieux : Sols, eaux (salées ou non), air, plantes, compts, gisements... grâce à leur adaptation et leur résistance à certaines conditions très hostiles (Lechevalier, 1981 ; Goodfellow et Williams, 1983).

Les sols sahariens d'Algérie qui représentent un écosystème particulier, renferment un potentiel considérable en actinomycètes (Sabaou *et al.*, 1998 ; Boudjella, 1994 ). L'équipe de microbiologie du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'école normale

supérieure de Kouba, a isolé sélectivement plusieurs souches d'actinomycètes et beaucoup d'entre-elles se sont révélées être de nouvelles espèces capables de produire un grand nombre de molécules antibiotiques (Badji *et al.*, 2005; 2006 et 2007; Boudjella *et al.*, 2007 ; Lamari *et al.*, 2002). C'est le cas d'une souche désignée BA4 qui a été isolée d'un sol saharien, et identifiée au genre *Streptomyces*.

Le genre *Streptomyces* est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de nombreux laboratoires dans le monde. Les espèces de ce genre synthétisent près de 80% des antibiotiques naturels commercialisés et utilisés en médecine (Watve *et al.*, 2001 ; Yoon *et al.*, 2006 ; Zwarts, 2008).

Les études menées au laboratoire de biologie des systèmes microbiens de l'E.N.S. de Kouba ont montré la richesse des sols sahariens en Actinomycètes avec une grande diversité des genres allant des plus fréquents (*Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*) aux plus rares (*Saccharothrix*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Streptorangium*) (Sabaou *et al.*, 1998 ; Zitouni, 2005, Lamari, 2006).

Pour notre part nous nous sommes intéressés à l'étude d'une nouvelle souche d'Actinomycète (BA4) provenant de la palmeraie de Béni-Abbès et appartenant au genre *Streptomyces*. Nous nous sommes fixés comme objectif de varier les sources d'azote dans les milieux de cultures semi-synthétiques utilisés et d'étudier leur influence sur la production d'antibiotiques contre les bactéries multirésistantes.

- Le premier chapitre de notre travail, est réservé à une étude bibliographique sur les actinomycètes, leur taxonomie, leur importance et leur écologie ainsi que sur les antibiotiques en général, et ceux du genre *Streptomyces* en particulier.
- Le second chapitre a trait au matériel et aux méthodes utilisées. Nous avons décrit toutes les techniques et le matériel nécessaire à la réalisation de ce travail.
- Enfin, le troisième chapitre est réservé à la présentation de tous les résultats obtenus ainsi qu'à leur discussion. Une conclusion finale et des perspectives sont aussi proposées à la fin de ce travail.

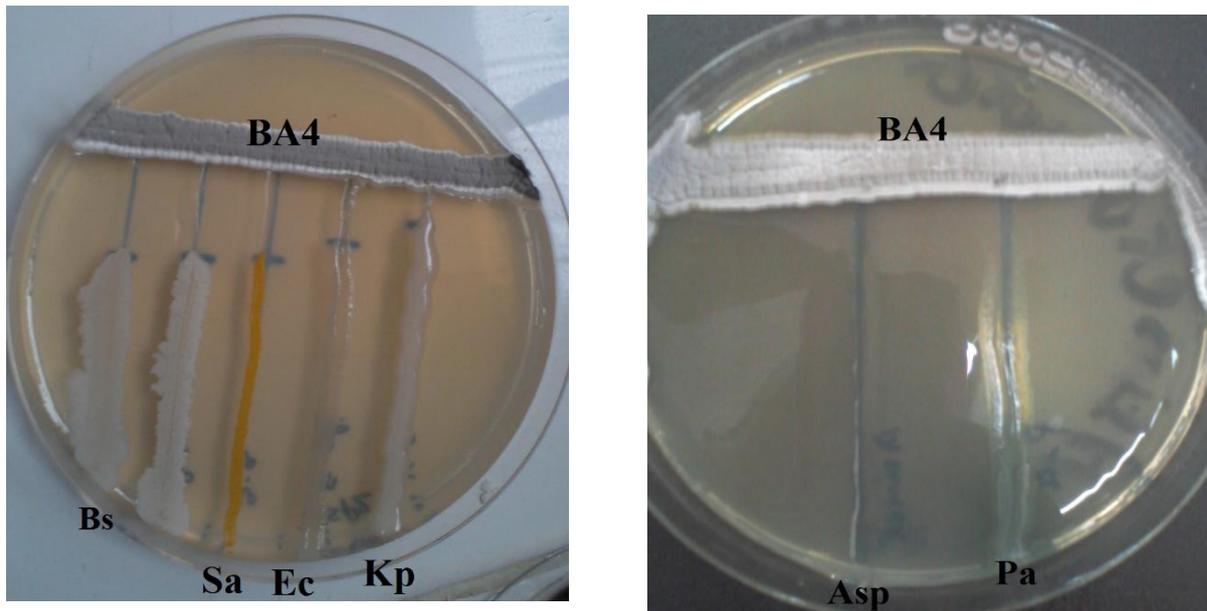
### I. Mise en évidence de l'activité antibiotique sur milieu solide

Le pouvoir antibactérien de la souche BA4 de *Streptomyces* des sols sahariens de Béni-Abbès a été effectué par la méthode des stries croisées contre sept bactéries dont deux à Gram positif (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633)) et quatre à Gram négatif (*Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter (CLM) sp* et *Klebsiella pneumoniae* (E40)). Ces deux dernières sont des bactéries multirésistantes aux antibiotiques. Les tests ont été réalisés sur un milieu de culture solide l'ISP2.

Les résultats des tests d'antagonisme sont donnés dans le tableau 6 et la figure 12. Nous remarquons que la souche BA4 présente une activité généralement forte et un spectre large qui s'étend sur toutes les bactéries testées pathogènes pour l'homme et multirésistantes aux antibiotiques et ce, quel que soit le profil de résistance. Les bactéries les plus sensibles à BA4 sont les bactéries à Gram positif (*Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et la bactérie à Gram négatif multirésistante *Acinetobacter sp* (CLM). En revanche, les bactéries les moins sensibles à BA4 sont *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922) et *Klebsiella pneumoniae* (E40) sur laquelle l'activité antibiotique est très faible.

Il est connu que les bactéries à Gram négatif soient plus résistantes que les bactéries à Gram positif (Prescott *et al.*, 2003). Des résultats analogues ont été obtenus sur le genre *Streptomyces* et les autres genres sahariens. Ainsi la capacité des souches appartenant à ce genre et aux genres rares d'origine saharienne à produire des antibiotiques a été déjà soulignée (Hacène *et al.*, 1994 ; Sabaou *et al.*, 1998) et de nouvelles molécules (étudiées uniquement chez les genres rares) ont ainsi été mises en évidence (Hacène *et al.*, 1998 et 2000 ; Lamari *et al.*, 2002 a.b ; Zitouni *et al.*, 2004 a.b ; Badji *et al.*, 2006 et 2007 ; Boudjella *et al.*, 2007 et 2010 ; Merrouche *et al.*, 2010).

Cependant, il ne semble pas y avoir une corrélation assez nette entre la multirésistance des bactéries à Gram négatif aux antibiotiques et leur résistance à ceux sécrétés par notre souche. Cela suppose que la souche BA4 sécrète des antibiotiques autres que ceux auxquels les bactéries résistent.



**Figure 10 :** Activité antibactérienne de la souche BA4 par la méthode des stries croisées sur milieu ISP2.

**Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Ec :** *Escherichia coli* (ATCC 25922), **Pa :** *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), **Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Kp :** *Klebsiella pneumoniae* (E40), **Asp :** *Acinetobacter sp* (CLM).

**Tableau 4:** Résultats du test antibactérien de la souche BA4 réalisé par la méthode des stries croisées sur milieu de culture ISP2 (distance d'inhibition en mm).

Les germes-cibles	Bactéries à Gram+		Bactéries à Gram-			
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 6633)	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E40)	<i>Acinetobacter sp</i> (CLM)
Distance d'inhibition (en mm)	15Net	18Net	11Net	10Net	5 Net	25Net

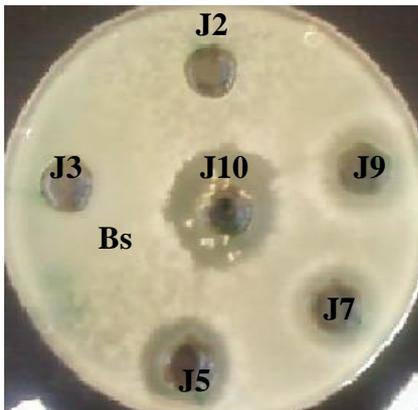
**Net :** Inhibition de la croissance,

### II. Cinétique de croissance et de production des antibiotiques en milieux liquides

Cette expérience est réalisée avec un milieu de culture semi-synthétique additionné d'une source de carbone, l'amidon (1%) et des sept sources d'azotes (l'asparagine, la tryptone, la DL-alanine, l'extrait de levure, le nitrate de calcium, le sulfate d'ammonium et le nitrate d'ammonium), dans le but de déterminer la meilleure source qui permet une forte production d'antibiotiques. Les microorganismes-cibles sont : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Acinetobacter* sp (CLM) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

La figure 13 représente les résultats de la méthode des puits de diffusion.

Les diamètres d'inhibition tiennent compte de celui des puits qui est de 10 mm.



**Figure 11 :** Mise en évidence de l'activité antibiotique de la souche BA4 par la méthode des puits de diffusion sur milieu MH.

**Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) « germe-cible », **J :** Jour du prélèvement.

## Résultats

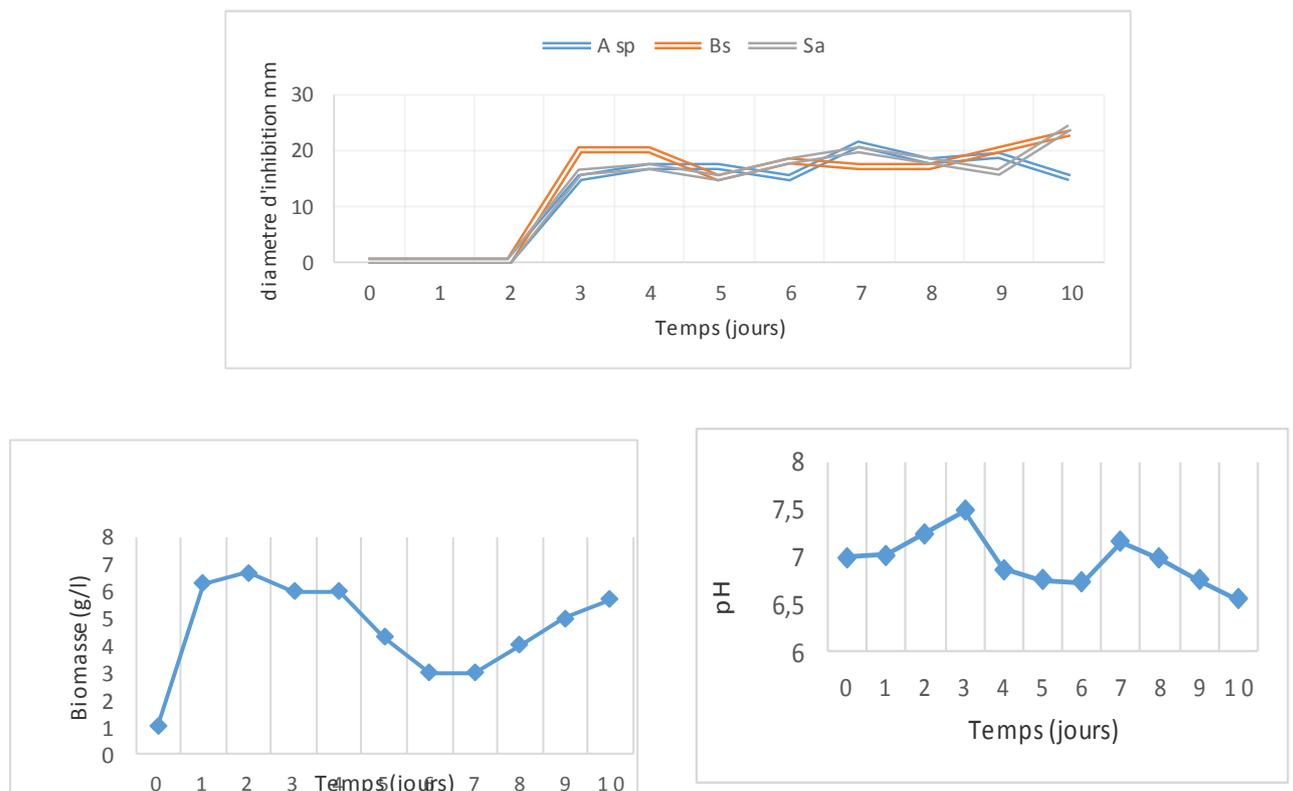
### 1. Milieu MS additionné d'asparagine

En présence d'asparagine (source organique : acide aminé), la croissance débute par une phase exponentielle entre J0 et J2. Une phase de déclin a lieu du 2<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour, puis de nouveau une croissance additive notée entre le 7<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour.

Au cours de la croissance, le pH augmente légèrement (de 7 à 7,49) durant la phase exponentielle puis diminue jusqu'à 6,88 au 4<sup>ème</sup> jour lors de la phase de déclin, puis il augmente légèrement au 7<sup>ème</sup> jour (pH 7), ensuite il s'acidifie de nouveau au cours de la croissance additive qui suit jusqu'à atteindre une valeur de 6,56.

La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre les bactéries à Gram positif, ainsi que la bactéries à Gram négatif, cela à la fin de la phase exponentielle, elle atteint l'optimum au 7<sup>ème</sup> jour contre *Acinetobacter sp* (CLM), au 10<sup>ème</sup> jour contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MS additionné d'asparagine sont illustrées par la figure 14.



**Figure 12 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS additionné d'asparagine).

**Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633),  
**Asp :** *Acinetobacter sp* (CLM).

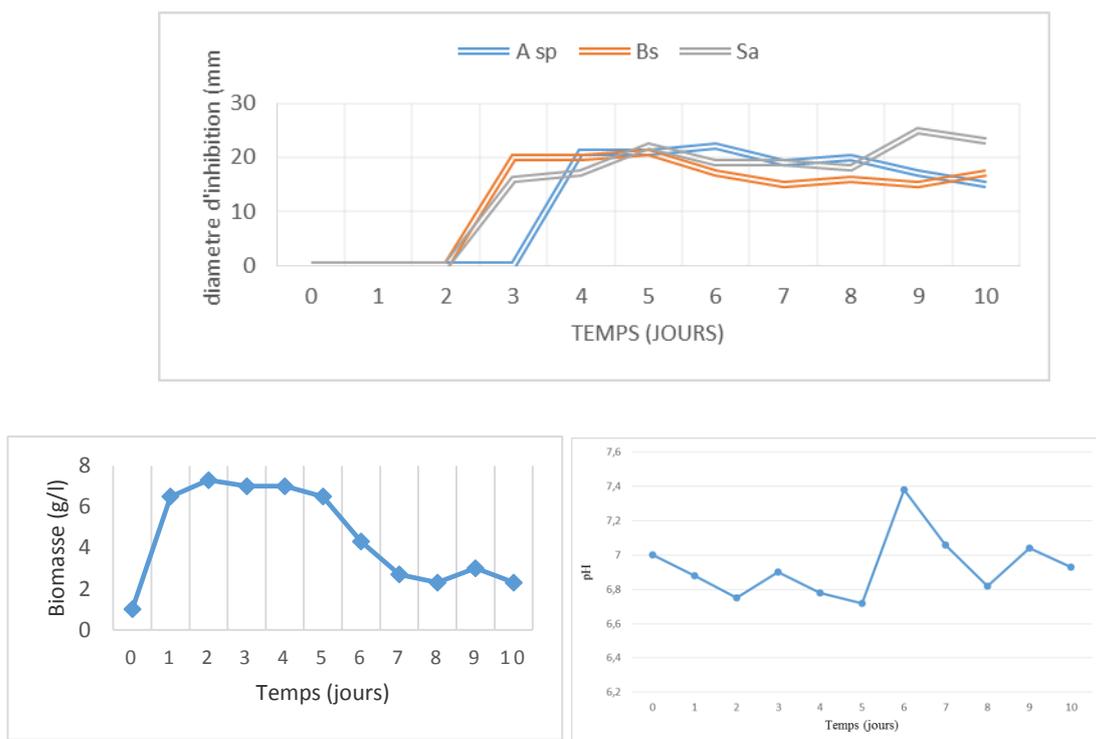
### 2. Milieu MS additionné de DL-alanine :

Une phase exponentielle d'une durée de 48h (J0 à J2) est observée durant la cinétique de croissance. La croissance entame une phase stationnaire qui dure 5 jours (J2 à J7), suivie par une phase de déclin qui survient au delà du 7<sup>ème</sup> jour.

Nous remarquons une légère acidification du pH (de J0 à J5) qui se basidifie pendant le J6 pour diminuer les jours suivants jusqu'à atteindre 6.82 le J10.

La production d'antibiotiques est très forte contre les bactéries à Gram positif, elle débute le 3<sup>ème</sup> jour contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et atteint deux optima, le premier au 5<sup>ème</sup> jour lors de la phase de déclin et le deuxième au 9<sup>ème</sup> jour, et la croissance débute au 03<sup>ème</sup> jour durant la phase de déclin, contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). Concernant la bactérie à Gram négatif multirésistante *Acinetobacter sp*, la production d'antibiotique débute au 04<sup>ème</sup> jour au cours de la phase de déclin pour atteindre l'optimum au 6<sup>ème</sup> jour.

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MS additionné de la DL-alanine, sont illustrées par la figure 14.



**Figure 13 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS additionné de la DL-alanine. **Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp :** *Acinetobacter sp* (CLM).

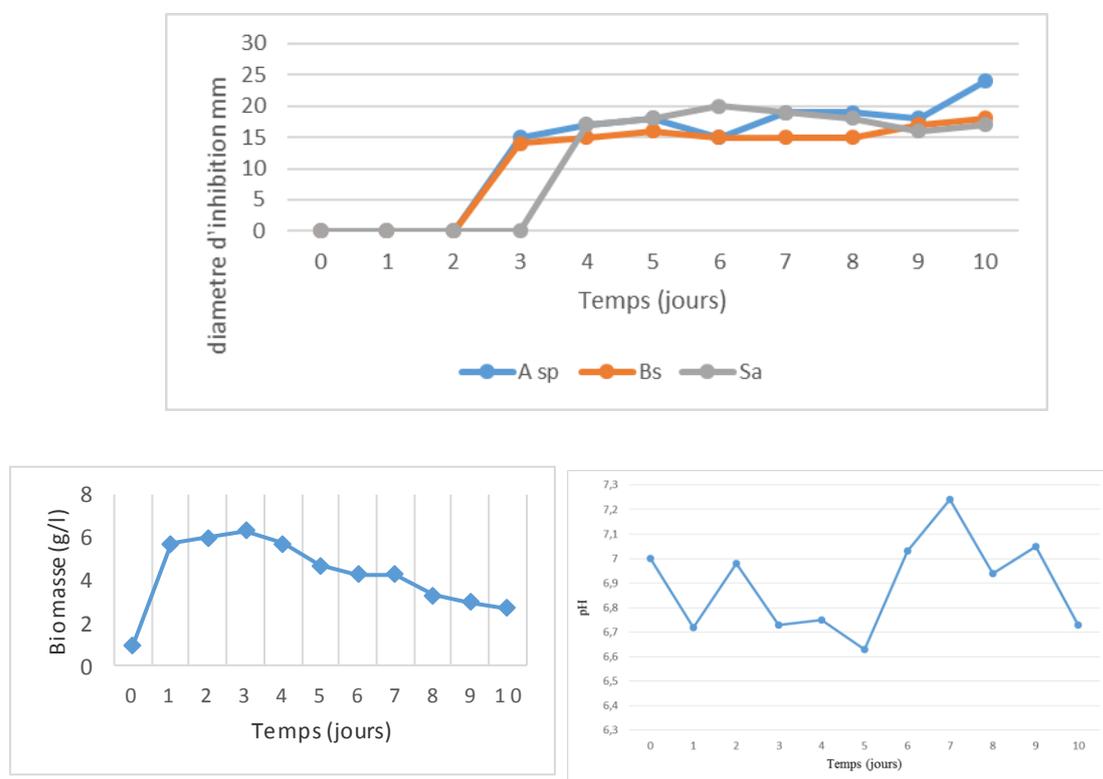
### 3. Milieu MSS additionné de la tryptone

En présence de tryptone (source organique complexe) la croissance débute par une phase exponentielle entre J0 et J3, suivie par une phase de déclin a lieu du 3<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour.

Le pH diminue légèrement (de J0 à J5) pour atteindre une valeur de 6.63 au 5<sup>ème</sup> jour, puis il se basidifie pendant le J7 pour diminuer les jours suivants jusqu'à atteindre 6.73 le J10.

La production d'antibiotiques apparait au 03<sup>ème</sup> jour à la fin de la phase exponentielle pour atteindre l'optimum au 10<sup>ème</sup> jour contre *Acinetobacter sp* et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), et concernant *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), la production débute le 04<sup>ème</sup> jour et atteint l'optimum au 06<sup>ème</sup> jour.

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MSS additionné de la tryptone, sont illustrées par la figure 15.



**Figure 14 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MSS additionné de la tryptone.

**Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp :** *Acinetobacter sp* (CLM).

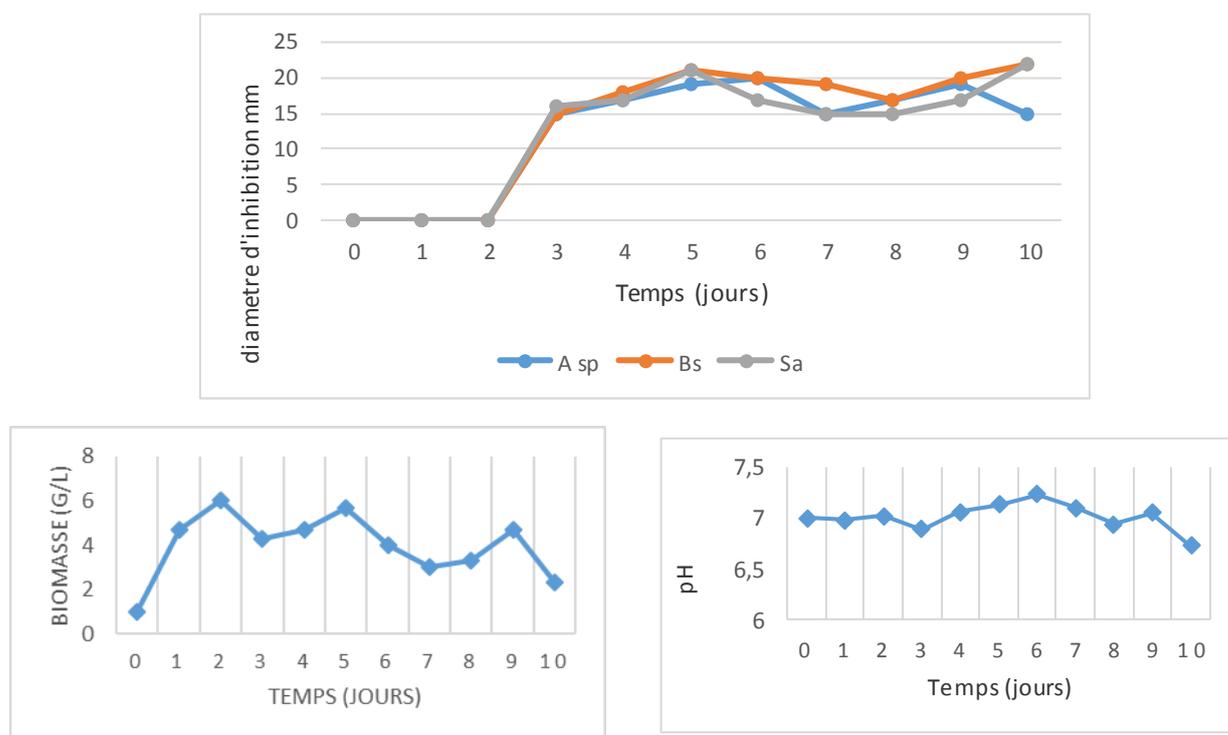
### 4. Milieu MSS additionné d'extrait de levure :

Une phase exponentielle est également observée au début de la cinétique d'une durée de 48h (J0 à J2). Avant de passer dans une phase de déclin, une phase stationnaire a lieu entre le 2<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour. Au delà du 8<sup>ème</sup> jour survient une croissance additive.

Une légère augmentation de pH (de 7 à 7,02) est notée durant la phase exponentielle. Lors de la phase stationnaire, il atteint une valeur de 6.89 au début puis il augmente jusqu'à 7,24 au 6<sup>ème</sup> jour ensuite cette valeur va diminuer à 6.73 au 10<sup>ème</sup> jour (au cours de la croissance additive).

La production d'antibiotiques contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), débute le 3<sup>ème</sup> jour, le maximum de production est atteint au 5<sup>ème</sup> et au 10<sup>ème</sup> jour de la cinétique. En ce qui concerne *Acinetobacter sp* (CLM), la production apparaît au 3<sup>ème</sup> en marquant l'optimum au 10<sup>ème</sup> jour.

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MSS additionné d'extrait de levure, sont illustrées par la figure 16.



**Figure 15 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MSS additionné d'extrait de levure.

**Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp :** *Acinetobacter sp* (CLM).

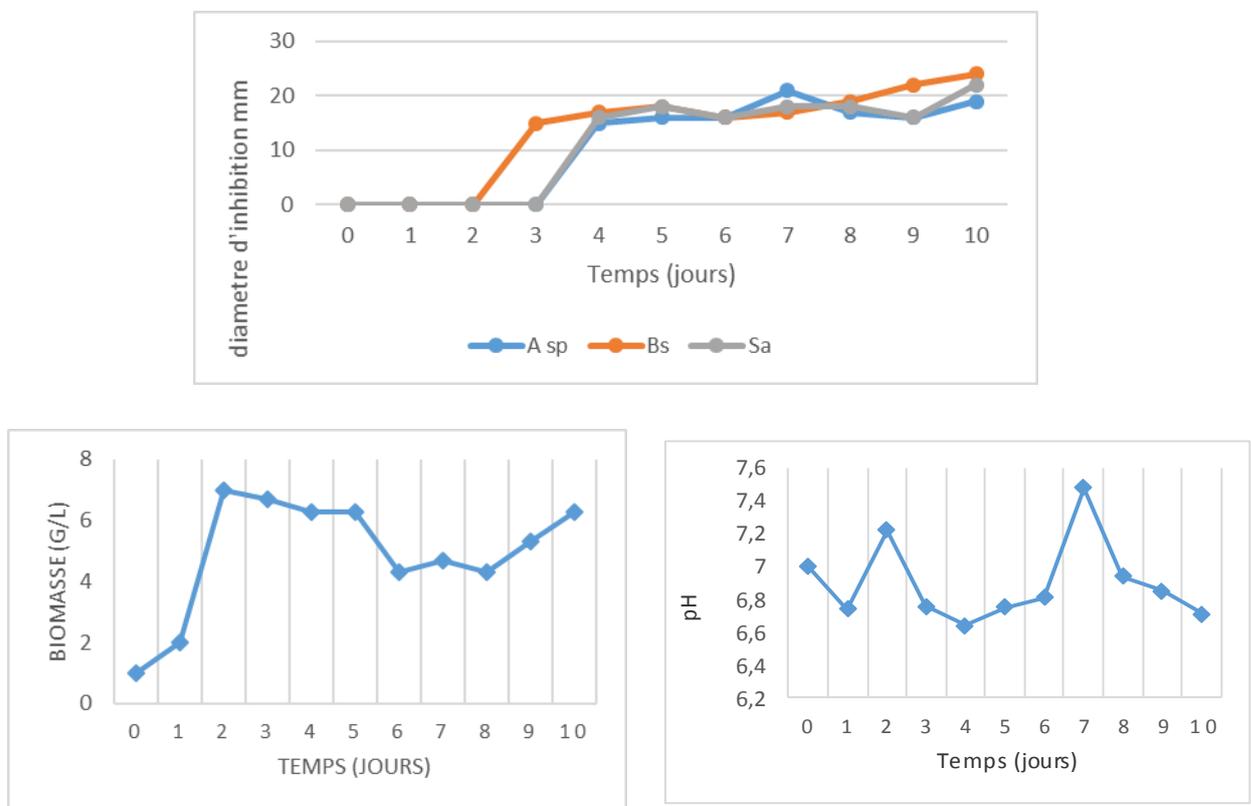
### 5. Milieu MS additionné de nitrate de calcium :

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle d'une durée de 48h (J0 à J2), après une phase stationnaire de 72h (J2 à J5), une phase de déclin est notée le 6<sup>ème</sup> jour, ensuite une croissance cryptique entre J6 et J10.

Les premiers jours (J0 à 6J) le pH varie légèrement entre 6,8 et 7, puis il se basidifie jusqu'à atteindre 7,6 le 7<sup>ème</sup> jour. Ensuite une baisse de pH est remarquée durant les 72h qui suivent.

La production d'antibiotiques débute le 3<sup>ème</sup> jour contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), elle est maximale au 10<sup>ème</sup> jour. Elle apparaît au 4<sup>ème</sup> jour contre les deux autres bactéries. Le maximum de production est noté au 10<sup>ème</sup> jour contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et au 7<sup>ème</sup> jour contre *Acinetobacter* sp (CLM).

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MS additionné de nitrate de calcium, sont illustrées par la figure 17.



**Figure 16 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS additionné de nitrate de calcium).

**Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp :** *Acinetobacter* sp (CLM).

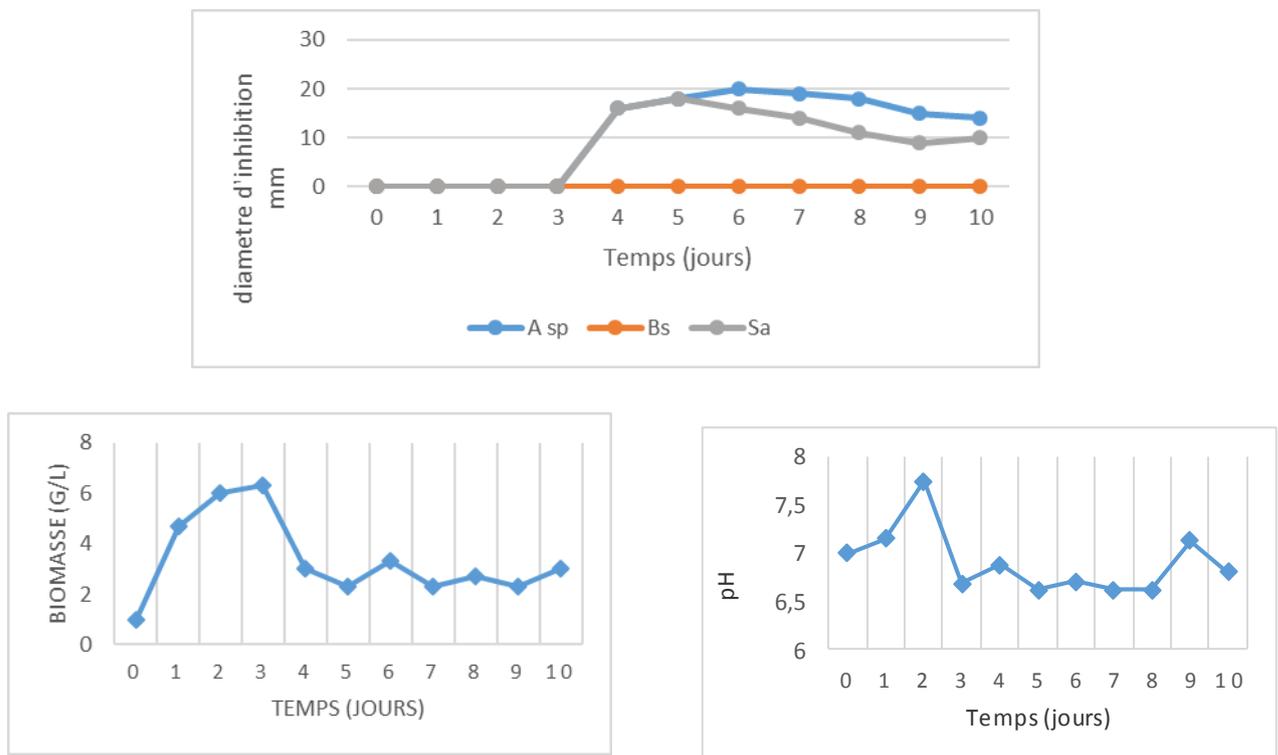
### 6. milieu MS additionné de sulfate d'ammonium :

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle d'une durée de 72h (J0 à J3), suivie par une phase de déclin qui a lieu du 3<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour.

Une légère augmentation de pH (de 7 à 7,75) est notée durant la phase exponentielle. Ensuite le pH s'acidifie progressivement durant la phase de déclin.

La production d'antibiotiques contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), débute le 4<sup>ème</sup> et le maximum de production est atteint au 5<sup>ème</sup> jour de la cinétique. En ce qui concerne *Acinetobacter sp* (CLM), la production apparait au 5<sup>ème</sup> en marquant l'optimum au 10<sup>ème</sup> jour. Uucune activité n'a été remarquée contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MS additionné de sulfate d'ammonium, sont illustrées par la figure 18.



**Figure 17 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS additionné de sulfate d'ammonium).

**Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp :** *Acinetobacter sp* (CLM).

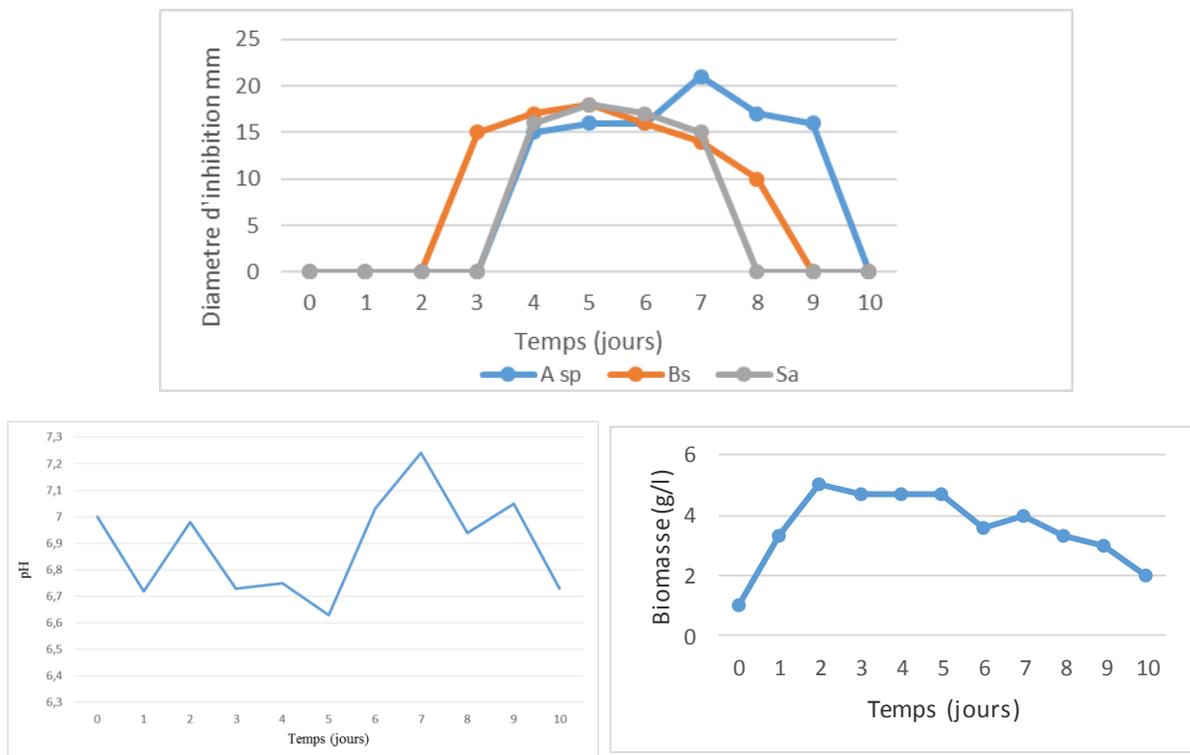
### 7. Milieu MS additionné de Nitrate d'ammonium:

La courbe de croissance débute par une phase exponentielle d'une durée de 48h (J0 à J2), après une phase stationnaire de 72h (J2 à J5), une phase de déclin est notée entre le 6<sup>ème</sup> et 10<sup>ème</sup> jour de l'incubation.

Une légère diminution de pH est notée durant la phase exponentielle et atteint 6.6 au 5<sup>ème</sup> jour. Ensuite, Puis le pH se basidifie le J5 et J7 pour se s'acidifier à nouveau les 72h qui suivent.

La production d'antibiotiques contre *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Acinetobacter* sp (CLM), débute au 4<sup>ème</sup> jour durant la phase stationnaire, le maximum de production est atteint au 7<sup>ème</sup> jour contre *Asp* et au 5<sup>ème</sup> jour de la cinétique contre *Sa*. En ce qui concerne *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), la production apparait au 3<sup>ème</sup> en marquant l'optimum au 3<sup>èm</sup> jour.

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche BA4 en milieu MS additionné de nitrate d'ammonium, sont illustrées par la figure 29.



**Figure 18 :** Cinétiques de production des antibiotiques et évolution du pH et de la biomasse de la souche BA4 en milieu MS additionné de nitrate d'ammonium.

**Sa :** *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs :** *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp :** *Acinetobacter* sp (CLM).

### Discussion

D'après les résultats obtenus nous avons constaté que la production des antibiotiques dépend de la nature de la source d'azote ajoutée au milieu de culture. En effet une activité antibiotique a été notée en présence de toutes les sources d'azote d'origine inorganique (nitrate, sels d'ammonium) ou organique simple (asparagine, DL alanine) ou organique complexe (extrait de levure, tryptone). Cette activité est légèrement importante avec les sources organiques simples ou complexes qu'avec les sources inorganiques utilisées tel que le sulfate d'ammonium où l'activité antibactérienne tend à diminuer au 10<sup>ème</sup> jour contrairement à celle notée avec les autres sources d'azote utilisées.

L'évolution du pH au cours des cinétiques a présenté de légères variations avec une alcalinisation puis une acidification du milieu durant les 10 jours de fermentation. Cette alcalinisation du milieu coïncide avec les pics d'activités antibactériennes. La dégradation des sources azotées organiques induit la basification du milieu par la libération et l'accumulation de l'ammoniaque dans le milieu suite à une désamination de ces acides aminés. De telles constatations ont été énoncées par **Strub (2008)** pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions ammonium lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques.

Les cultures avec les différentes sources d'azote ont montré une phase exponentielle de croissance et parfois une phase stationnaire puis la phase de déclin suivie d'une croissance cryptique, laquelle a été déjà signalée chez plusieurs microorganismes (**Prescott et al., 2002**). Cette croissance cryptique peut être expliquée par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. Ce phénomène a aussi été observé chez plusieurs souches de *Streptomyces* (**Driche, 2010; Toumatia, 2010**).

La production des métabolites secondaires par les microorganismes a lieu durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinomycètes cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire et de déclin (Zitouni, 2005 ; Badji, 2006). Dans le cas de la souche BA4 les maxima sont notés durant les deux phases stationnaires et de déclin.

Les courbes d'activité de la souche sont plus ou moins irrégulières, avec parfois plus d'un maximum. Ceci suggère la production de plusieurs antibiotiques par la souche. D'ailleurs, la majorité des actinomycètes isolées dans notre laboratoire produisent chacun plusieurs antibiotiques (Lamari et al., 2002 a, b ; Badji, 2006 ; Boudjella et al., 2007).

Plusieurs maxima de production d'antibiotiques ont également été observés lors des cinétiques de certaines souches de *Streptomyces* qui se sont avérées en fin de compte produire chacune 3 à 4 antibiotiques (Aouiche, 2010 ; Driche, 2010 ; Toumatia, 2010).

### **III. Extraction des antibiotiques et antibiographie**

L'extraction a été réalisée à partir des filtrats de culture et du mycélium puis les extraits obtenus ont été testés par antibiographie.

#### **1. Activité antibactérienne des extraits des filtrats de culture**

L'extraction est effectuée avec 3 solvants organiques de différentes polarités (dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) à partir des filtrats de culture de la souche BA4 (en milieu semi-synthétique additionné des 04 différentes sources d'azote) au 10<sup>ème</sup> jour d'incubation.

Ces filtrats sont répartis chacun en 3 fractions de 35 ml et chaque fraction est extraite avec 35 ml d'un des trois solvants utilisés. Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses et testées pour leur antagonisme par la méthode des disques de papier contre les microorganismes-cibles choisis : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Acinetobacter* sp (CLM).

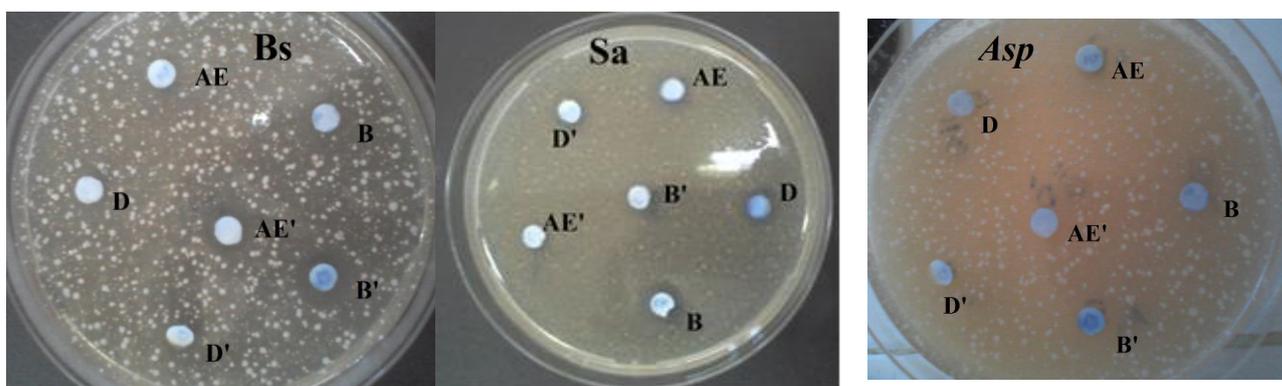
Le tableau 7 et la figure 21 représentent les résultats de l'activité antibactérienne des extraits organiques (le diamètre du disque est compris dans les valeurs indiquées, il est de 6 mm).

Nous remarquons que l'activité antibactérienne est retrouvée dans les extraits organiques des trois solvants utilisés. La capacité d'extraction est assez proche entre ces solvants, avec cependant une légère préférence pour le *n*-butanol suivi par l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane et qui présentent presque la même capacité d'extraction.

Les extraits organiques au *n*-butanol, au dichlorométhane et à l'acétate d'éthyle ont donné un résultat meilleur avec les milieux synthétiques à l'asparagine, au tryptone, à l'extrait de levure et au nitrate de calcium, que ceux des milieux synthétiques au sulfate d'ammonium, au nitrate d'ammonium et à la DL-alanine.

#### **2. Activité antibactérienne des extraits mycéliens**

L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium est réalisée avec le méthanol. Les extraits obtenus sont analysés par la méthode des disques de papier. Ils ne présentent aucune activité antibactérienne.



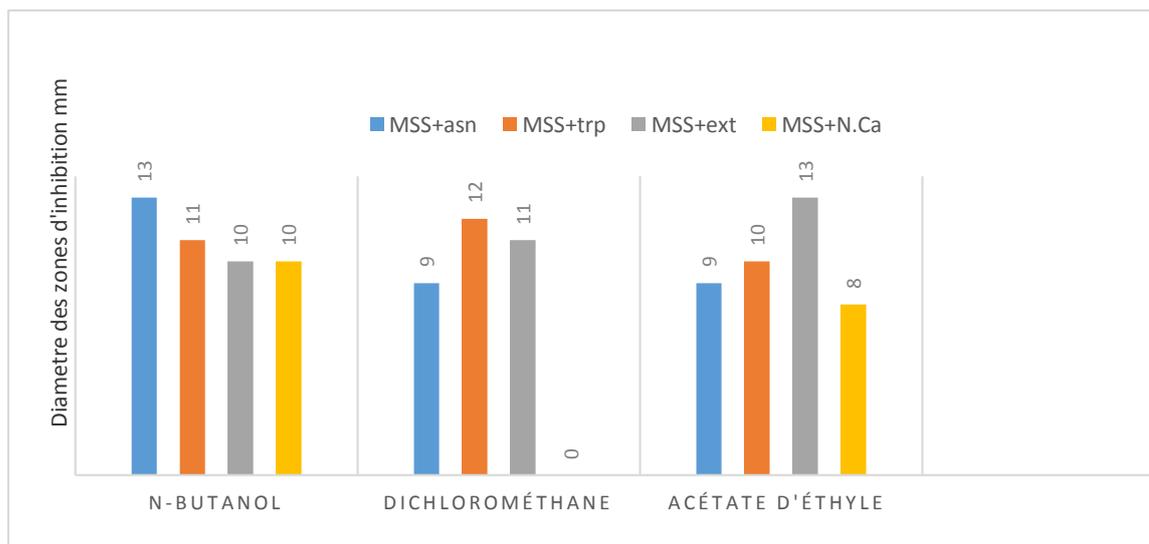
**Figure 19 :** Antibiographie des extraits organiques de la souche BA4.

**D,D'** : Extrait au dichlorométhane, **AE, AE'** : Extrait à l'acétate d'éthyle, **B,B'** : Extrait au *n*-butanol.

**Sa** : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), **Bs** : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), **Asp** : *Acinetobacter* sp (CLM ).

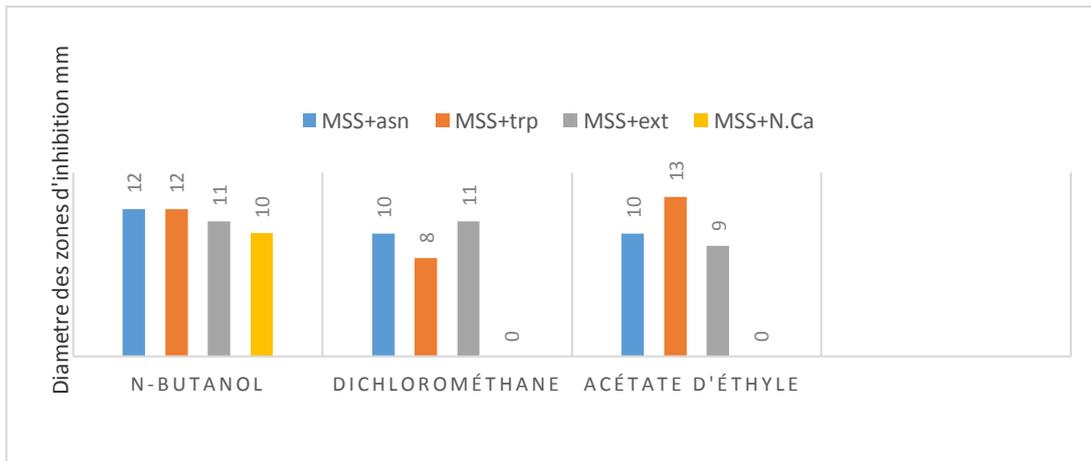
**Tableau 5 :** Résultats des antibiographies des extraits organiques de la souche BA4 provenant du milieu semi\_synthétique additionné de différentes sources d'azotes : l'asparagine, la tryptone, l'extrait de levure et le nitrate de calcium (diamètre d'inhibition en mm, y compris le diamètre du disque = 6 mm). **Rce**

Les germes-cibles	Les milieux de culture	Les solvants d'extraction		
		Acétate d'éthyle	Dichlorométhane	<i>n</i> -Butanol
<i>Staphylococcus Aureus</i> (ATCC 25923)	MS + asn	09	09	13
	MSS + trp	10	12	11
	MS + N.Ca	08	R	10
	MSS + ext	13	11	10
<i>Acinetobacter</i> sp (CLM)	MS + asn	10	10	12
	MSS + trp	13	08	12
	MS + N.Ca	10	R	10
	MSS + ext	09	11	11
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	MS + asn	11	11	13
	MSS + trp	14	10	10
	MS + N.Ca	10	12	12
	MSS + ext	13	9	14



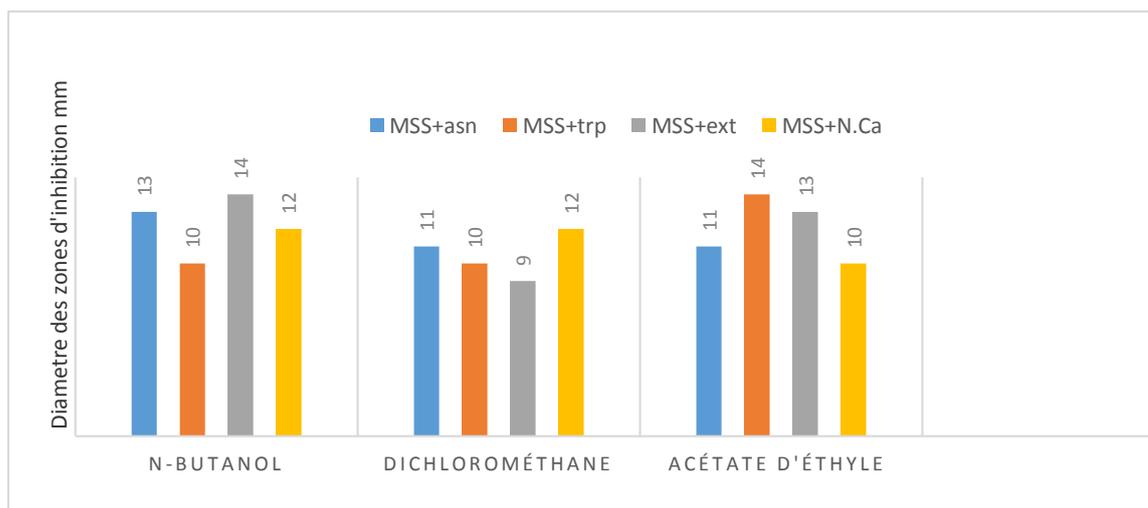
**Figure 20 :** Activités des extraits organiques de la souche BA4 de *Streptomyces* sp sur *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923).

Les activités des extraits au n-butanol sur *Staphylococcus Aureus* (ATCC 25923) des différentes sources d'azote sont plus importantes que celles extraites à l'acétate d'éthyle ou au dichlorométhane. Néanmoins, les extraits des milieux MSS asparagine (extrait au n-butanol) et MSS extrait de levure (extrait à l'acétate d'éthyle) ainsi que MSS tryptone (extrait au dichlorométhane) ont une activité significative sur la même souche par rapport aux autres extraits.



**Figure 21 :** Activités des extraits organiques de la souche BA4 de *Streptomyces* sp sur *Acinetobacter* sp (CLM).

L'extrait du milieu MSS tryptone à l'acétate d'éthyle a une activité plus importante sur *Acinetobacter* sp par rapport à celui au n-butanol ou au dichlorométhane. Cependant les activités des extraits butanoliques des différentes sources d'azote sont importantes comparativement à ceux au dichlorométhane ou à l'acétate d'éthyle.



**Figure 22 :** Activités des extraits organiques de la souche BA4 de *Streptomyces* sp sur *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

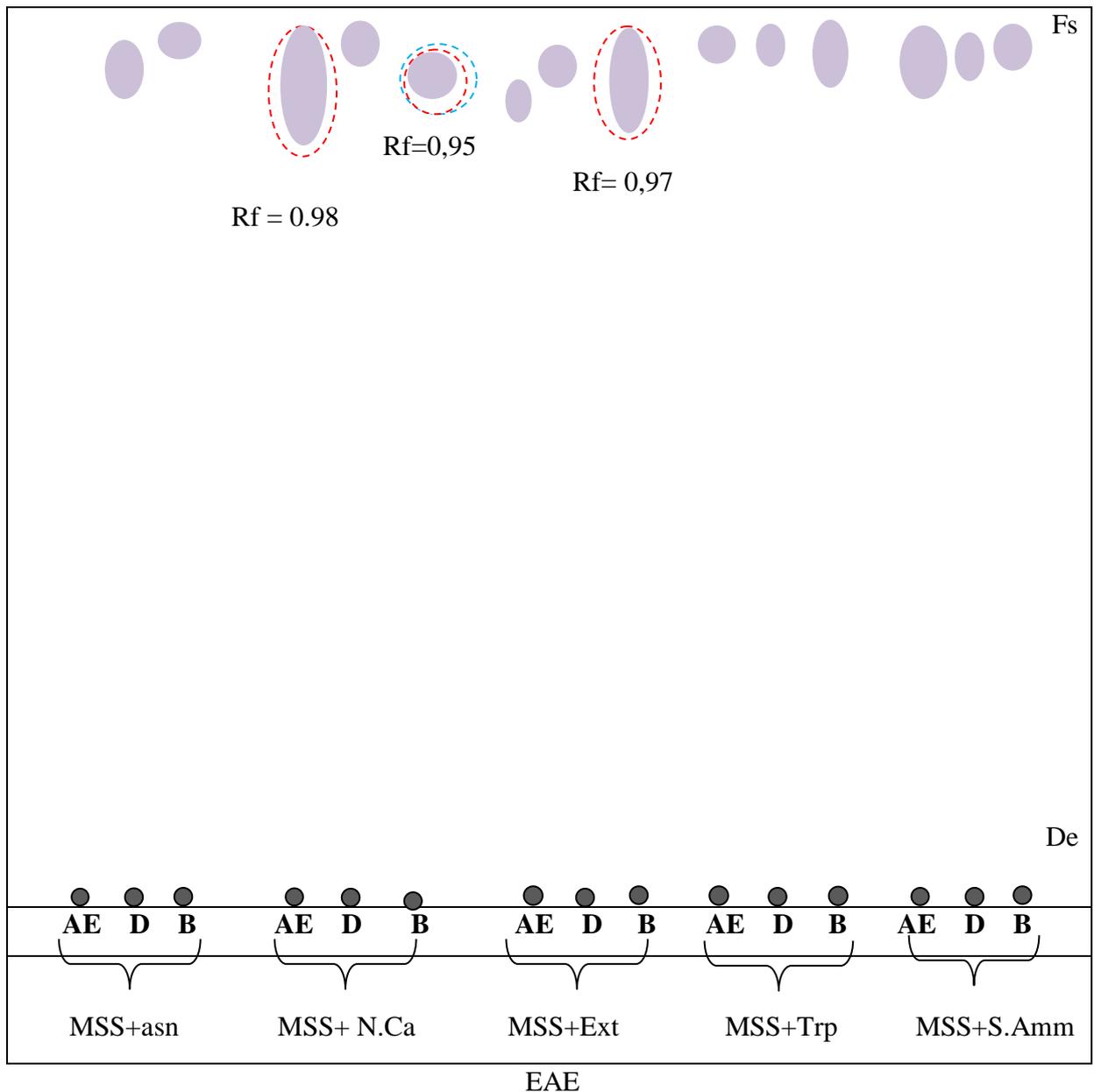
Les extraits butanoliques des milieux MSS asparagine et extrait de levure ainsi que ceux à l'acétate d'éthyle des milieux MSS tryptone et extrait de levure présentent des activités importantes sur *Bacillus subtilis* par rapport à ceux au dichlorométhane.

### **IV. Mise en évidence des antibiotiques par bioautographie**

Pour mettre en évidence l'activité d'antibiotiques synthétisés au cours du jour de production maximale (10<sup>ème</sup> jour) sur le milieu semi-synthétique, nous avons réalisé une bioautographie sur un système de solvants de migration qui est le EAE (éthanol-ammoniaque-eau, 80-10-10 en volume). Après développement des plaques par chromatographie sur couche mince de gel de silice G60 (CCM), les zones actives sont révélées sous la lumière UV. Ces analyses qui ont été effectuées sur les extraits organiques à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol. Les résultats obtenus sont illustrés par la figure 25.

- Deux taches actives produites dans le milieu SS additionné du nitrate du calcium, une est extraite par l'acétate d'éthyle et son Rf = 0,98 agit contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), et l'autre tâche est extraite par le *n*-butanol à Rf = 0,95 agit contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).
- Une tache active extraite par le *n*-butanol, produite dans le milieu SS additionné de l'extrait de levure et son Rf = 0,97, Cette activité agit contre *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

**Bs - Sa**



**Figure 23 :** Localisation des activités antibiotiques des extraits organiques des filtrats de cultures de la souche BA4 par bioautographie

**EAE:** Système de solvants ( Ethanol-ammoniaque-eau, 8-1-1 en volume)

 Auréole d'inhibition de *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

 Auréole d'inhibition de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923).

 Taches observées sous UV (254 nm)

**AE:** Extrait à l'acétate d'éthyle, **B:** Extrait au n-butanol, **D:** Dichlorométhane.

**De:** Depot des extraits, **Fs:** Front de solvant, **Rf:** Rapport frontal.

### Discussion générale

L'antagonisme exercé à distance par la souche BA4 de *Streptomyces* contre les différentes bactéries pathogènes multirésistantes. (Annexe 1) est attribué au phénomène de l'antibiose (**Baker et Cook, 1974**). Cet antagonisme est exercé par la diffusion des molécules antibiotiques, dans notre cas, par des molécules à activité antibiotique.

Ce genre d'interaction entre les microorganismes a été exploité pour la recherche de nouvelles molécules antibiotiques en utilisant la méthode des stries croisées. C'est une technique de criblage précoce, largement utilisée dans les programmes de recherche. Simple et pratique, elle consiste à rechercher les propriétés antibiotiques des actinomycètes cultivés sur milieu solide (**Williston et al., 1947**) et ainsi déterminer leur spectre d'activité contre un nombre de cibles microbiennes (bactéries, champignons et levures). Le milieu de culture doit avoir la propriété de permettre une bonne croissance de la souche d'actinomycète et également celle des souches-cibles. Les résultats obtenus sont qualitatifs et permettent d'orienter la suite du travail lors du passage à la production en milieu liquide (**Velho-Pereira et Kamat, 2011 ; Larpent et Sanglier, 1989**).

La souche BA4 de *Streptomyces* possède de fortes potentialités inhibitrices contre les bactéries pathogènes et multirésistantes aux antibiotiques que ce soit à Gram positif ou négatif.

Les cinétiques de croissance et de production des antibiotiques par cette souche ont été menées en conditions liquides et en agitation, en utilisant le milieu synthétique en présence de sept sources d'azotes. Le MS a déjà été utilisé dans le laboratoire LBSM de Kouba et est connu pour être parmi les plus favorables à la production d'antibiotiques (Zitouni, 2005 ; Badji, 2006 ; Lamari, 2006 ; Boudjella, 2007 ; Toumatia, 2010 ; Driche, 2010 ; Aouiche, 2010).

Dans les différentes conditions de culture, nous avons observé après la phase de déclin une croissance additive (assez faible), appelée communément croissance cryptique, laquelle a été déjà signalée chez plusieurs microorganismes (**Prescott et al., 2002**). Cette croissance cryptique peut être expliquée par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. Ce phénomène a aussi été observé chez plusieurs souches de *Streptomyces* (**Driche, 2010 ; Toumatia, 2010**).

L'évolution du pH au cours de l'incubation a présenté de légères variations (une basification, puis une acidification et enfin une remontée progressive du pH), entre 6,62 et

7,95 durant les 10 jours de fermentation. L'acidification serait due à la dégradation du glucose présent dans le milieu de culture. La dégradation des sources azotées organiques, tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure, induit la basification du milieu après libération et accumulation de l'ammoniac, et ce, suite à une désamination de ces acides aminés. De telles constatations ont été énoncées par **Strub (2008)** pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions ammonium lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques.

La source d'azote peut être d'origine inorganique (sels d'ammonium, nitrates) ou organique simple (acides aminés) ou encore organique complexe (extrait de levure, extrait de malt, peptone, tryptone). Plusieurs travaux ont également rapporté l'effet de différentes sources d'azote sur la production d'antibiotiques par des souches de *Streptomyces*. Ces effets sont très variables de souche à souche.

Les résultats révèlent que le taux de production des antibiotiques peut être considérablement influencé par la nature de la source d'azote ajoutée au milieu de culture.

Les résultats révèlent la présence d'une activité antibiotique plus ou moins importante en présence de l'asparagine, de l'extrait de levure et du nitrate de calcium.

La présence du nitrate d'ammonium dans le milieu à une concentration de 0,25% n'a pas favorisé la production d'une activité antibiotique. Cela peut s'expliquer par le fait que les sulfates d'ammonium représentent une source d'azote rapidement assimilable par les *Streptomyces* et que cela peut réprimer la biosynthèse des métabolites secondaires. Il a été montré qu'une concentration trop importante en ions ammonium pouvait inhiber la production d'antibiotiques (**Aharonowitz et Friedrich, 1980 ; Brana et Demain, 1988**)

Pour les acides aminés, la littérature apporte qu'ils peuvent être partagés parmi ceux qui stimulent, inhibent ou restent neutres envers la production des métabolites secondaires, selon leur capacité à excréter des ions ammonium dans le milieu de culture.

Les antibiotiques sécrétés en présence des différentes sources d'azote, par la souche BA4 ont fait l'objet d'extraction par trois solvants de polarité croissante ; L'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et le *n*-butanol. Ces expérimentations ont été menées de manière à essayer de semi-purifier les antibiotiques si ceux-ci sont extractibles.

Les trois solvants ci-dessus ont très souvent été utilisés (Berdyet *al.*, 1987 ; Brycroff, 1988). Le *n*-butanol (qui extrait le plus de composés) a été souvent le meilleur solvant d'extraction des antibiotiques sécrétés par les souches d'actinomycètes suivi par le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle, les mêmes résultats sont obtenus par (Zitouni, 2005 ; Badji, 2006 ; Boudjella, 2007). Certains antibiotiques, très hydrophiles, peuvent ne pas

être extractibles par les solvants organiques et rester ainsi dans la phase aqueuse (Zitouni, 2005 ; Bennadji et Tabout, 2010).

Les bioautographies des extraits à l'acétate d'éthyle et au *n*-butanol ont montré la présence de plusieurs antibiotiques dans le milieu synthétique en présence du nitrate de calcium et d'extrait de levure. La production de ces derniers varie selon la source d'azote et le germe-cible utilisé (Driche, 2010).

Nous avons déjà suggéré la présence de plusieurs antibiotiques lors de la réalisation des cinétiques en raison de l'obtention de plusieurs maxima de production.

Plusieurs espèces d'actinomycètes appartenant à des genres différents sont capables de produire de nombreux antibiotiques, une quinzaine ou plus chez *Saccharothrix* sp. SA103 (Zitouni, 2005) et *Saccharothrix algeriensis* SA233 (Lamari, 2006), plus d'une trentaine chez *Nonomuraea* sp. (Badji, 2006) et au minimum quatre chez *Streptomyces* sp. MS8 (Belghit, 2010) et *Streptomyces* sp. AA1 (Toumatia, 2010).

## CONCLUSION

Dans le présent travail nous nous sommes intéressés à l'étude de l'influence des sources d'azotes sur la croissance et la production d'antibiotiques d'une souche d'actinomycète, BA4, qui a été isolée à partir d'un échantillon de sol de la palmeraie de Béni-Abbès et faisant partie de la collection du laboratoire de microbiologie de l'E.N.S. de Kouba (Alger).

Le screening réalisé sur notre isolat de streptomycètes a permis d'évaluer ses potentialités antagonistes vis-à-vis de plusieurs souches bactériennes pathogènes pour l'homme et multirésistantes aux antibiotiques, isolées de divers hôpitaux d'Algérie. Notre isolat présente une activité généralement forte et un spectre large qui s'étend sur toutes ces bactéries.

Les cinétiques de croissance et de production des antibiotiques par la souche d'actinomycètes BA4 ont été menées sur le milieu synthétique à l'amidon avec les sources d'azotes suivantes : tryptone, DL-Alanine, asparagine, extrait de levure, sulfate d'ammonium, nitrate de calcium et nitrate d'ammonium.

La croissance est caractérisée par une seule phase exponentielle (croissance classique), avec une présence d'une phase stationnaire sur tous les milieux de culture à l'exception du milieu semi-synthétique additionné de l'extrait de levure, et une présence d'une phase cryptique (Additive). La production d'antibiotiques débute en fin de phase exponentielle, en phase stationnaire ou en phase de déclin, elle peut aussi apparaître au cours de la croissance additive et les quantités maximales sont obtenues durant une de ces phases.

Les antibiotiques produits par cette souche d'actinomycètes sont bien extraits par le n-butanol, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle.

Ce travail qui ne présente qu'une étude préliminaire sur les antibiotiques de la souche d'actinomycètes BA4, peut ouvrir certaines perspectives qui peuvent être résumés comme suit :

- Poursuite des travaux afin d'élucider la structure chimique des antibiotiques les plus intéressants.
- L'optimisation de la production d'antibiotique en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources carbonées, éléments minéraux, aérien ; pH, etc.).
- La réalisation des tests complémentaires ( antitumoral, antiviral, inhibition d'enzymes, etc.) afin de déterminer le spectre d'action de chacun des antibiotiques.
- La réalisation des tests de toxicité des antibiotiques sécrétés par la souche d'actinomycètes vis-vis des cellules animales, afin de mieux évaluer leur intérêt dans le domaine médical ou vétérinaire.

- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de chaque antibiotique purifié contre les bactéries multi résistantes que nous avons utilisées lors de notre étude. Il serait intéressant également de faire les tests contre d'autres genres bactériens à Gram positif et à Gram négatif qui posent d'énormes problèmes de santé à cause de leur multirésistance, ainsi que contre des champignons pathogènes responsables de dermatoses.

## **I. Les Actinomycétales :**

### **1. Définition :**

Dans le manuel de Bergey de 1994, l'ordre des actinomycétales fut défini comme regroupant des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés lesquels peuvent être assez développés pour former un véritable mycélium. Le diamètre de ces filaments varie entre 0,5 et 2  $\mu\text{m}$ .

Les actinomycètes comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté et sporulant. Les formes évoluées possèdent un mycélium aérien sporulant (reproduction asexuée) qui leur confère un aspect fongique d'où l'expression « ray fungi » ou « champignons rayonnants », utilisés parfois entre 1930 et 1960.

### **2. Ecologie et Distribution dans l'environnement :**

Les actinomycètes sont retrouvés presque partout dans la nature. Ils constituent une part importante de la flore tellurique : 10 à 20% ou parfois plus (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Ishizawa et Araragi, 1976).

On les retrouve dans l'air, le fumier et les composts, le foin et les pailles, les grains de céréales, les résidus fibreux de canne à sucre, le pollen des plantes et bien d'autres substrats (Lacey, 1973; Breuilland *et al.*, 1974; Couch et bland, 1974; Goodfellow et Williams, 1983; Jensen *et al.*, 1991; Lacey, 1997; Groth *et al.*, 1999).

Ils sont présents dans les sols polaires gelés en permanence, tout comme dans les sols désertiques chauds et secs, dans le pétrole brut, les sols hautement contaminés avec les métaux lourds ou le pétrole, les lacs extrêmement alcalins et les lacs salés et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4000 m de profondeur (Cross, 1981; Goodfellow et Williams, 1983; Khattabi *et al.*, 2002). En revanche, ils semblent être absents des eaux minières très acides ( $\text{pH} < 1$ ) et des sources thermales très chaudes d'origine volcanique (Lechevalier, 1981).

La plupart des souches décrites sont saprophytes et présentent une capacité de dégradation de très nombreuses sources nutritives pour leur développement (Gonzalez *et al.*, 2005). Quelques-unes peuvent être pathogènes ou symbiotes de plantes ou d'animaux (Williams *et al.*, 1983 ; Suzuki *et al.*, 1994).

Les actinomycètes préfèrent un pH compris entre 7 et 8 et un taux d'humidité peu élevé, de l'ordre de 5 à 25%. Comme les autres bactéries du sol, la plupart des actinomycètes sont mésophiles et neutrophiles. Cependant, quelques espèces de *Streptomyces* sont acidophiles (Hagedom, 1976) et certains genres, tels que *Thermoactinomyces*, sont thermophiles (Lacey et Cross, 1989). Ce sont généralement des aérobies stricts sauf certaines espèces qui sont anaérobies facultatifs (*Oerskovia*) ou microaérophiles (*Actinomyces* et *Agromyces*) (Lechevalier, 1972). Certains genres sont retrouvés en milieux aquatiques, comme par exemple *Micromonospora*, *Rhodococcus* et *Actinoplanes* (Cross, 1981).

### **3. Distribution dans les sols Sahariens d'Algérie :**

Les sols sahariens sont des écosystèmes assez particuliers en raison de l'environnement aride sévissant au Sahara. Plusieurs travaux ont été entrepris sur divers sols provenant de palmeraies, de regs, de croutes salées, d'alluvions, de gisements (fer et tungstène), de paléosols et de jardins.

Les résultats ont montré que ces sols sahariens sont riches en actinomycètes de point de vue quantitatif et qualitatif. Ces microorganismes représentent 15 à 80% de la microflore totale dans les sols moyennement, peu ou pas salés. Le genre *Streptomyces* prédomine dans la majorité des échantillons analysés (80 à 90 % du total) (Sabaou *et al.*, 1998).

### **4. Importance des Actinomycètes :**

#### **4.1. Intérêt dans ans les domaines médical, industriel et biotechnologique :**

Les actinomycètes constituent un groupe très utile dans le domaine industriel grâce à leur forte capacité à produire de nombreuses substances dont plus de 70% des antibiotiques naturels du monde (Zhao *et al.*, 2006), certains étant utilisés dans la thérapeutique (antibactériens, antifongiques, antiviraux, insecticides, herbicides, etc.), des vitamines, ainsi que des activateurs immunitaires (Vandamme, 1985). Ils produisent également des substances ayant des activités antiparasitaires telles que les antimalarias (distamycine), les acaricides (altémicidine), les anticoccidiens et certains enzymes qui peuvent avoir des applications médicales (neuramidinases, estérases et oxydases des stérols) ou en biologie moléculaire (endonucléases de restriction) (Lombardi et Crisanti, 1997 ; Raty *et al.*, 2002).

### **4.2. Intérêt dans le domaine agronomique et vétérinaire :**

Les actinomycètes jouent un rôle important dans les phénomènes de biodégradation.

Ils permettent le recyclage de polymères complexes tels que les polysaccharides, la chitine et même les lignocelluloses des plantes ( Lechevalier, 1981), grâce à leurs enzymes ( amylases, xylanases et chitinases )( Bischoff *et al.*, 1981). Ils sont aussi capables de dégrader les pesticides de différentes structures chimiques, y compris des organochlorés, thiazines, carbamates, organophosphates, etc. (Castillo *et al.*, 2006). Grâce à leur propriétés antagonistes, les actinomycètes sont aussi utilisés dans la lutte biologique des maladies des plantes (Merrouche, 2000 ; Meklat, 2004). Ils sont également capables de promouvoir la croissance des plantes et sont utilisés comme fertilisants.

Les actinomycètes sont capables de fixer l'azote atmosphérique grâce au genre *Frankia* qui s'associe avec de nombreux arbres comme *Casuarina* et forme avec eux des nodules racinaires ( Lechevalier, 1981 ; Vessey, 2003). Ils sont également capables de dégrader ou de transformer certains toxines produites par des champignons toxigènes ( Mycotoxines) et réduire ainsi leur teneur dans les produits finaux en agroalimentaire ( Holzapfel *et al.*, 2002). Les antibiotiques sécrétés par les actinomycètes sont aussi beaucoup utilisés dans les élevages des animaux pour combattre les maladies, ainsi que dans l'alimentation (cas de la spiramycine) pour accroître les rendements zootechniques ( Schwarz *et al.*, 2001).

### **4.3. En pathologie :**

La majorité des actinomycètes sont très utiles et seules quelques espèces sont pathogènes responsables d'infections humaines, animales et végétales. Ces espèces appartiennent en grande majorité aux genres *Corynebacterium*, *Mycobactérium*, *Actinomyces*, *Nocardia*, *Actinomadura* et à un degré moindre à *Streptomyces* (Lechevalier, 1981 ; Mc Neil *et al.*, 1992). Parmi les maladies, nous pouvons citer la diphtérie, la tuberculose, la lèpre, les actinomycétomes les nocardioses, les actinomycoses, etc. (Goodfellow et Williams, 1983 ; Mc Neil *et al.*, 1992).

### **5. Taxonomie :**

La taxonomie des actinomycètes est basée sur plusieurs critères : morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. L'identification des genres est facilitée par les études morphologiques tandis que les critères physiologiques et moléculaires (ex : hybridation ADN-ADN) séparent les espèces.

### **5.1. Critères actuels d'identification des genres**

L'identification des genres d'actinomycètes est basée sur les critères morphologiques et chimiques. Si pour certains genres (*Streptosporangium*, *Planomonospora*, etc.), les caractères morphologiques sont suffisants pour leur détermination, pour de nombreux autres (*Actinomadura*, *Nocardia*, etc.), les caractéristiques chimiques des cellules (composition en acides aminés, sucres, lipides) sont obligatoires en plus des études morphologiques.

#### **5.1.1. Critères morphologiques**

##### **5.1.1.1. Caractères macromorphologiques (ou cultureux)**

Ces caractères reposent sur la production ou non d'un mycélium aérien (MA), la présence d'un mycélium du substrat (MS), la production ou non de pigments mélanoides, ainsi que la détermination de la couleur du MA, du MS et des pigments diffusibles.

##### **5.1.1.2. Caractères micro morphologiques**

Le mycélium aérien peut être stérile, fragmenté ou sporulant. Il peut produire des spores mobiles ou non, isolées ou regroupées par 2, par 4 ou en chaînes plus ou moins longues. Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores courts ou longs ou encore formées anarchiquement sur le MA. Chez certains actinomycètes, le mycélium aérien peut contenir des structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou les endospores.

Le mycélium du substrat peut être stérile, fragmenté ou persistant. Il peut produire ou non des spores (mobiles ou non) ou des sporanges.

### **5.1.2. Critères chimiques**

Ces critères consistent à déterminer les constituants majeurs se trouvant au niveau de la paroi cellulaire, de la membrane plasmique ou des cellules entières. Les principaux constituants sont l'acide diaminopimélique, les glucides cellulaires et les lipides membranaires et pariétaux.

#### **5.1.2.1. Acide diaminopimélique et autres acides aminés**

L'acide diaminopimélique (DAP) peut être sous forme isomérique LL ou DL (mésos) et ce, selon les genres, par exemple : LL pour *Streptomyces* et DL pour *Saccharothrix*. Parfois, le DAP est remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique chez les actinomycètes ne formant pas de véritable mycélium (Holt *et al.*, 1994).

#### **5.1.2.2. Glucides cellulaires**

Les sucres des cellules entières sont classés en « non caractéristiques », c'est-à-dire taxonomiquement non importants (ribose, glucose,...) et en « caractéristiques » ou taxonomiquement importants (couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose » et « rhamnose-galactose ») (Lechevalier et Lechevalier, 1970a).

Becker *et al.* (1964 et 1965) et Lechevalier et Lechevalier (1970a, b) ont ainsi distingué plusieurs chimiotypes de parois cellulaires basés sur la composition cellulaire en acides aminés et en sucres (Tableau 1).

#### **5.1.2.3. Lipides membranaires et pariétaux**

Chez certains genres d'actinomycètes, la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour leur identification. Il était alors indispensable d'analyser les lipides cellulaires, principalement les phospholipides (lipides polaires), les ménaquinones (à noyau quinone méthylé), les acides gras et les acides mycoliques (ces derniers étant des lipides pariétaux complexes insaturés).

La composition des membranes cellulaires en phospholipides a permis de diviser les actinomycètes en 5 types lesquels sont résumés dans le tableau 2 (Lechevalier *et al.*, 1977).

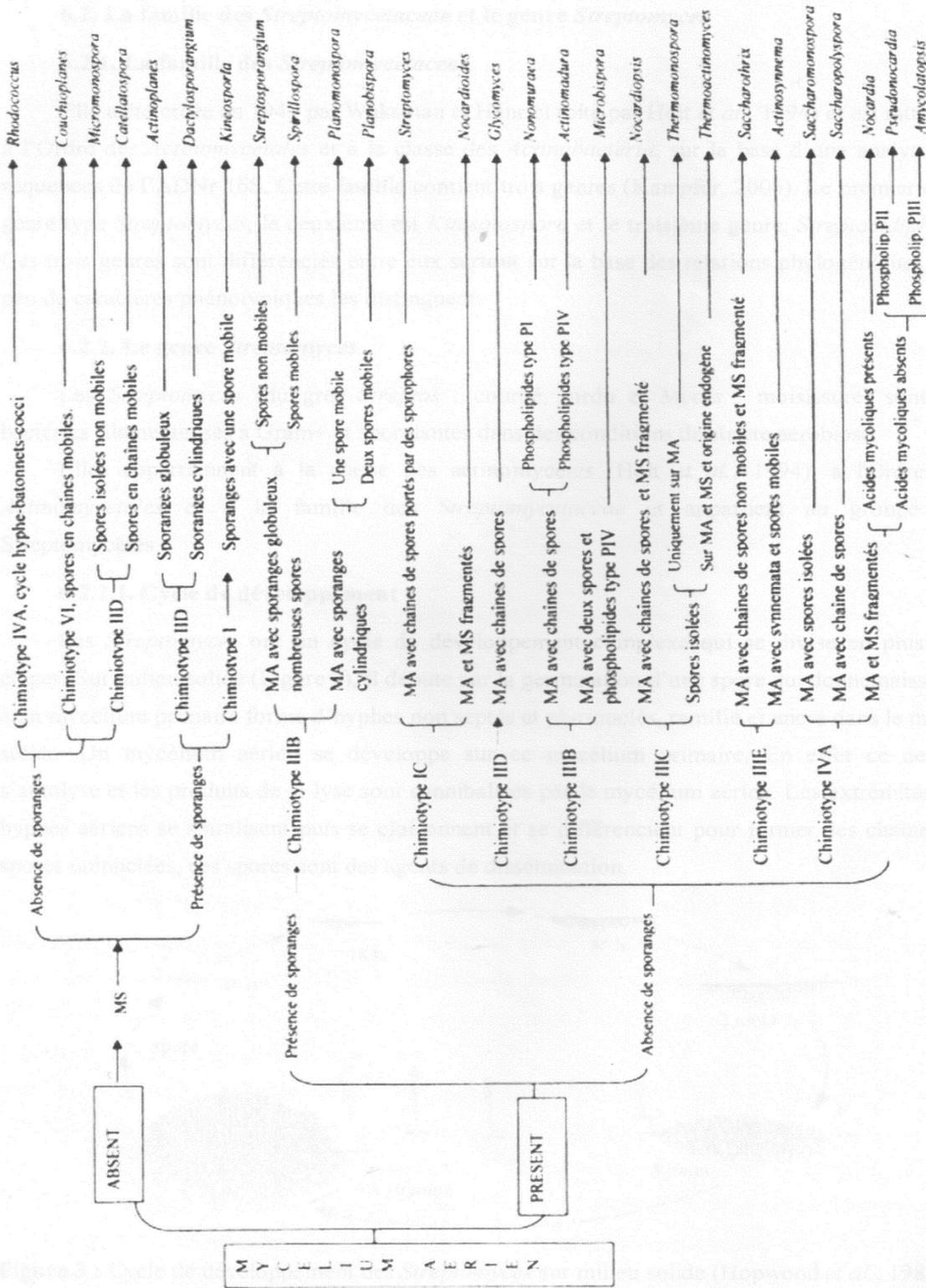


Figure 1. clé d'identification partielle des principaux genres d'actinomycètes (Lamari, 2006)  
 MA : mycélium aérien, MS : mycélium du substrat.

**6. Le genre *Streptomyces* :**

**6.1. Position taxonomique :**

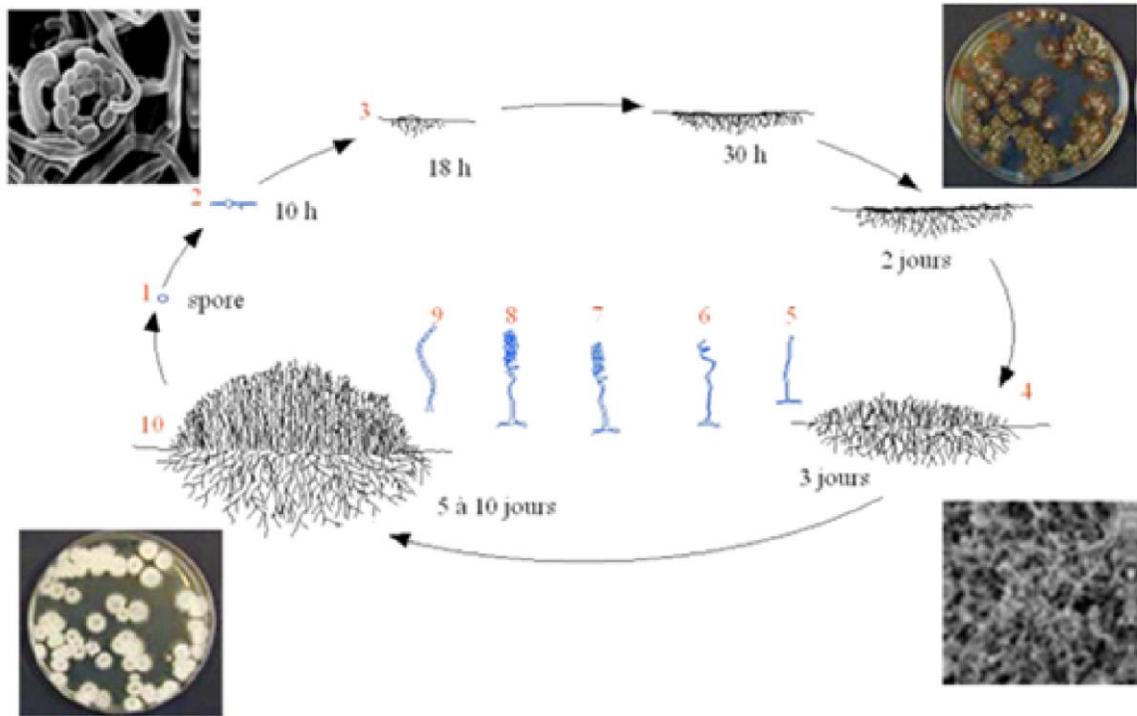
C'est le plus grand genre du monde bactérien, il renferme plus de 500 espèces, quelques espèces sont données dans le tableau 3. Il appartient à la famille des *Streptomycetaceae* et au sous-ordre des *Streptomycetaceae*. Morphologiquement, il possède un mycélium du substrat abondamment ramifié, qui peut être sporulant chez certaines espèces, surmonté par un mycélium aérien filamenteux avec des filaments de formes variées : droits (*Rectos Flexibilis*), incurvés (*Retinaculum Apertum*) ou spiralés (*Spira*). Ces filaments présentent des conidies non mobiles en chaînes (jusqu'à 50 conidies) et ont une surface lisse, épineuse ou verruqueuse. La paroi est de type I (isomère LL de l'acide diaminopimélique) et ce genre ne contient pas de sucres caractéristiques ni d'acides mycoliques, son taux en GC varie de 68 à 78%.

Le génome des *Streptomyces* est composé d'une molécule linéaire d'ADN contenant huit millions de paires de bases, ce qui en fait un des plus grands génomes bactériens. Ils possèdent également des plasmides linéaires de très grande taille ainsi que, plus classiquement des plasmides circulaires (Hopwood, 1999).

**6.2. Cycle de développement :**

Les *Streptomyces* comme tous les actinomycètes présentent un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits (Locci et Sharples, 1984). Leur cycle de développement est complexe se divisant en plusieurs étapes. Sur milieu solide (Figure 4), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire (mycélium du substrat) formé d'hyphes non septés et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. Les extrémités des hyphes aériens se spiralisent puis se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uni nucléées, ces spores sont des agents de dissémination. Les chaînes de spores (jusqu'à 50 ou plus) sont de formes variées: droites (*Rectus Flexibilis*), incurvées ou en boucles (*Retinaculum Apertum*) ou spiralées (*Spira*). Les spores (ou conidies) ne sont pas mobiles et ont une surface lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue.

En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si de très rares *Streptomyces* peuvent sporuler dans cet environnement.



**Figure 02** Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide (Hopwood *et al.*, 1985).

## II. Les Antibiotiques :

### 1. Définition :

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (Bu'lock, 1965).

### 2. Classification des antibiotiques :

Les antibiotiques peuvent être classés d'après plusieurs critères : leur spectre d'action, leur type d'action, leur origine, leur mode d'action ou leur structure chimique (Asselineau et Zalta, 1973).

#### 2.1. Classification d'après le spectre d'action (Nekhili, 1996).

On distingue 4 types de spectres d'action vis-à-vis des micro-organismes cibles.

**Tableau 1.** Classification de quelques antibiotiques selon leur spectre d'action.

Spectre très large	Spectre large	Spectre moyen	Spectre étroit
Tétracyclines Chloramphénicol Céphalosporines	Streptomycine Rifampicine Fosfomycine	Pénicilline Lincomycine Novobiocine Erythromycine	Vancomycine : contre les bactéries (G+). Polymixines : contre les bactéries (G-). Nystatine, amphotéricine B, cycloheximide : contre les champignons.

#### 2.2. Classification d'après la structure chimique

En raison de leur structure chimique souvent complexe et de nature très variée, Plusieurs classifications sont possibles pour les antibiotiques. Berdy *et al.* (1987) propose un système de classification ouvert à tous les antibiotiques. Ce système les répartit en neuf grandes familles chimiques (Tableau 2) et il est le plus utilisé en recherche fondamentale.

**Tableau 2 :** Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Berdy, 1987).

Familles d'antibiotiques	Principales Sous-familles	Exemples d'antibiotiques
1-Antibiotiques contenant des glucides	- Glucides purs - Aminoglycosides - Glycopeptides	-Nojirimycine -Streptomycine,geniarnieine, kanamycine -Vancomycine, ristocétine
2-Lactones macrocyclics	-Macrolides -Polyènes -Autres Macrolaclames	-Spiramycine,érythromycine -Amphotéricine,nyslatine -Maytansine
3-Quinones et antibiotiques apparentés	-Composés Polycycliques condensés linéairement -Dérivés naphtoquinoniques -Dérivés anthatoquinoniques -Dérivés benzoquinoniques	-Tétracyclines -Rubromycine - Anthracyclines - Mitomycine, saframycine
4- Acides aminés et peptides	- Dérivés d'acides aminés - Homopeptides - Peptolides -Lipopeptides	-Cyclosérine, pénicillines - Bacitracine - Yalinomycine –Polymyxines
5-Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	-Hétérocycles non condensés - Hétérocycles condensés	-Mildiomycine – Phénazines
6-Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	-Dérivés du furanne - Polyènes	-Afiatoxine – Monensine
7- Antibiotiques acycliques	-Dérivés du cyclo-alcane - Terpenes - Oligoterpènes.	-Cyclohesimide - Acide marasmiq - Acide fusidique
8-Antibiotiques aromatiques	- Composés benzéniques - Aromatiques condensés -Composés non benzeniques - Autres dérivés aromatiques	-Chloramphénicol - Griséoflavin - Fusaricoline - Novobiocine
9-Antibiotiques aliphatiques	- Dérivés des alcanes -Dérivés d'acides carboxyliques aliphatiques - Composés contenant du phosphore ou du soufre	- Elaiomyceine - Cériuïne - Fosfomycine

### **2.3. Classification d'après leur type d'action** (Nekhili, 1996).

On distingue deux types d'action :

- **Bactéricides** : qui tuent les bactéries en phase de croissance (Pénicilline, céphalosporine), ou en phase de croissance et stationnaire (Streptomycine et polymyxine, etc.).
- **Bactériostatiques** : qui inhibent la croissance des bactéries (Tétracycline, chloramphénicol, érythromycine, lincomycine, etc.).

Cette classification est importante, par exemple dans les infections sévères chez les personnes immunodéprimés qui demandent un antibiotique de type bactéricide.

### **2.4. Classification d'après leur mode d'action** (Nekhili, 1996).

Il existe généralement quatre niveaux cibles dans la cellule microbienne :

- Les antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne.
- Les antibiotiques actifs sur la membrane plasmique.
- Les antibiotiques actifs sur les acides nucléiques.
- Les antibiotiques actifs sur la synthèse protéique.

Les exemples de ces antibiotiques sont cités ci-dessous ( tableau 3)

### **2.5. Classification d'après la charge électrique**

Les antibiotiques peuvent être à caractère acide (ex : penicilline, céphalosporine, novobiocine et fosfomycine), basique (ex : la majorité des macrolides, aminosides, rifamycine, érythromycine, polymyxines) ou neutre (ex : steffimicines, mutactimycines.).

## **3. Mode d'action des antibiotiques** (Nekhili, 1996).

Le mode d'action des antibiotiques est en relation avec sa structure chimique. En général, à chaque classe d'antibiotique est associé un site d'action dans la cellule microbienne. Ce site peut être la paroi cellulaire, la membrane plasmique, les ribosomes ou les composants génétiques.

Le tableau 3, résume les principales familles d'antibiotiques et leurs cibles et spectre d'action.

**Tableau 3.** Principales familles d'antibiotiques et cibles cellulaires.

Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi	Antibiotiques altérant la membrane plasmique	Antibiotiques inhibant la synthèse protéique	Antibiotiques inhibant la synthèse des acides nucléiques
B-lactamines, Glycopeptides, Fosfomycine	Polymyxines, Tyrothricine, Polyènes.	Macrolides, Tétracyclines, Aminosides, Chloramphénicol.	Rifampicine

#### **4. Microorganismes producteurs d'antibiotiques :**

La grande majorité des antibiotiques découverts provient de microorganismes. Parmi les microorganismes, l'ensemble des bactéries, actinomycètes compris, produit 80% des antibiotiques, les champignons étant à l'origine d'environ 20% d'entre eux (Breton *et al.*, 1989).

##### **4.1. Les bactéries non mycéliennes et les champignons**

Les bactéries produisent environ 10% (Larpent et Sanglier, 1989) et les champignons 20% (Breton *et al.*, 1989) du total des antibiotiques d'origine microbienne. Parmi les bactéries productrices, nous citerons les *Bacillaceae* (ex. : *B.subtilis*) et les *Pseudomonaceae* (ex. : *Pseudomonas*) avec respectivement 7% et 1.3%. Les antibiotiques produits par ce genre de bactéries sont généralement de nature peptidique (Vandamme, 1985). Ces antibiotiques sont plus souvent actifs sur les bactéries.

Parmi les champignons producteurs, nous citerons le genre *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* et *Trichoderma* (champignons imparfaits, ascomycètes) et aussi certains basidiomycètes et Zygomycètes (Betina, 1983 ; Laskin et Lechevalier, 1984). Les antibiotiques les plus connus sont par exemple, la pénicilline, la céphalosporine, l'acide fusidique, ect ...

### **4.2. Les actinomycètes**

Le genre *Streptomyces* est à l'origine du plus grand nombre de molécules actives connues (Goodfellow *et al.*, 1988 ; Okami et Hotta, 1988), près de 80% des antibiotiques sécrétés par les actinomycètes sont synthétisés par ce genre.

Plusieurs molécules bioactives sont commercialisées tels que la streptomycine, la kanamycine, le chloramphénicol, la néomycine, la novobiocine, la nystatine, etc.

Environ 20% des antibiotiques sécrétés par les *Streptomyces* ont un pouvoir antifongique, les 80% restants ayant des propriétés assez diverses: antibactériennes, antivirales, antihelminthes, insecticides, etc. (Berdy *et al.*, 1987).

Environ 10% des antibiotiques sont sécrétés par les souches de *Micromonospora* et de *Nocardia*, tandis que les 10% restants le sont par les autres genres, peu répandus ou parfois même rares : *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Streptosporangium*, *Saccharopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, etc.

### **5. Résistance bactérienne aux antibiotiques :**

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir au contact de la bactérie, puis pénétrer dans la cellule afin de se fixer à une cible et perturber le fonctionnement du microorganisme, sans être détruit ni modifié. Dans le cas contraire, il devient inefficace. Ce phénomène appelé résistance est lourd de conséquences. Ainsi, de nombreux microorganismes pathogènes classiques développent des résistances multiples aux antibiotiques.

Les bactéries se défendent contre l'action des antibiotiques: en se rendant imperméables à leur pénétration, en produisant des enzymes capables de les inactiver et/ou en modifiant la structure de leurs cibles.

Ces résistances peuvent être naturelles ou acquises consécutivement à des modifications de l'équipement génétique chromosomique ou plasmidique (mutations spontanées - 20% des résistances - ou échange par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon - 80% des résistances).

### **6. Les microorganismes résistants aux antibiotiques :**

#### **6.1. Microorganismes résistants à Gram positif**

##### **6.1.1. *Staphylococcus aureus***

C'est un coque pyogénique qui colonise la peau et les membranes muqueuses (Melles *et al.*, 2005). Cette espèce est responsable des infections de la peau et des tissus (furoncles, endocardite, abcès rénaux, etc.). Beaucoup de ces souches sécrètent également des toxines et sont responsables d'intoxications alimentaires (Robert, 1998).

##### **6.1.2. *Streptococcus pneumoniae***

La résistance aux (3-lactames est due à la diminution de l'affinité pour les antibiotiques (Fluit *et al.*, 2001). Cependant cette espèce utilise le mécanisme d'efflux et aussi une méthylase pour résister aux macrolides (Jensen *et al.*, 1999).

Le mécanisme de résistance aux fluoroquinolones, macrolides et lincosamides repose sur différents mécanismes : modification enzymatique de la cible et pompe à efflux des antibiotiques (Jensen *et al.*, 1999).

##### **6.1.3. Les entérocoques**

Les entérocoques peuvent être pathogènes, provoquant des endocardites, des infections urinaires et sanguines, etc. (Moellering, 1998).

Ils sont également responsables des infections nosocomiales particulièrement chez les personnes diabétiques, immunodéprimés, etc. (Courvalin, 2006 ; Caglar *et al.*, 2006).

#### **6.2. Microorganismes résistants à Gram négatif**

##### **6.2.1. *Pseudomonas aeruginosa***

C'est une bactérie pathogène opportuniste. Elle provoque plusieurs pathologies en particulier chez les patients immunodéprimés atteints de diabète, de cancer, de sida, etc. (Bodey, 2001). Cette espèce peut causer des pneumonies chroniques. Ainsi, *P. aeruginosa* est caractérisé par une aptitude particulière à l'acquisition de mécanismes de résistance pouvant conduire à une impasse thérapeutique (Tenover, 2006).

### **6.2.2. *Acinetobacter baumannii***

C'est une espèce pathogène opportuniste qui peut être responsable d'infections nosocomiales sévères malgré sa faible virulence, en particulier chez les patients immunodéprimés (Carbonne *et al.*, 2005). Cette espèce produit naturellement des (3- lactamases de type céphalosporinase et oxacillinase (Poirel *et al.*, 2005).

### **6.2.3. La famille des *Enterobacteriaceae***

#### **6.2.3.1. Le genre *Salmonella***

*Salmonella enterica* et *S. bongori* sont responsables de fièvres typhoïdes et de salmonelloses non typhiques qui représentent une cause majeure de diarrhées dans le monde, avec un taux important de mortalité infantile. La résistance au chloramphénicol, aux fluoroquinolones et à l'ampicilline est portée par un plasmide ou des plasmides multirésistants. Le traitement des infections aux salmonelles repose sur l'utilisation de l'amoxicilline et surtout du chloramphénicol (Dagnra *et al.*, 2007; Weill, 2008).

#### **6.2.3.2. *Escherichia coli***

C'est la principale espèce bactérienne impliquée dans les infections digestives et urinaires (Tagajdid *et al.*, 2008). Les seuls mécanismes de résistance aux quinolones connus sont d'origine plasmidique (Skurnik et Andremont, 2007).

#### **6.2.3.3. *Klebsiella pneumoniae***

C'est une bactérie pathogène responsable de pneumonies, mais elle provoque aussi des infections au niveau de l'appareil urinaire et de l'appareil intra-abdominal et est impliquée aussi dans les infections nosocomiales de la circulation sanguine (Podschn et Ullmann, 1998).

### **7. Biosynthèse et Optimisation de la production d'antibiotiques :**

Les antibiotiques constituent le groupe le plus important des métabolites secondaires (Dumenil et Sanglier, 1989). Ils sont sécrétés à la fin de la trophophase (phase de croissance) et le début de l'idiophase (phase stationnaire) chez les bactéries non mycéliennes. Par contre, chez les organismes filamenteux (actinomycètes et champignons), la biosynthèse des antibiotiques peut être couplée ou découplée par rapport à la croissance (Ghisalba et al, 1984).

Comme les besoins nutritionnels et les conditions de culture d'un microorganisme ne sont généralement pas les mêmes pendant la phase de croissance et la phase de production des métabolites secondaires, des milieux favorables ont dû être développés. Certains paramètres d'ordre nutritionnel et environnemental ont ainsi été régulés afin d'offrir les conditions optimales de production d'antibiotiques (Larpent et Sanglier, 1989). Ces paramètres concernent :

- certains composants du milieu de culture tels que le choix et les proportions des sources de carbone, d'azote, de phosphate inorganique ainsi que d'autres sels inorganiques, des oligoéléments, des précurseurs et d'autres facteurs.

- les conditions de culture, le choix du pH, de la température, de l'aération et de la vitesse d'agitation.

La production d'antibiotiques peut parfois être sous l'influence de certaines substances telles que le glucose, les phosphates et les ions ammonium qui peuvent ainsi exercer un effet répressif en relation avec la concentration utilisée et avec l'antibiotique produit (Larpent et Sanglier, 1989).

De même les manipulations génétiques des souches ont permis l'amélioration des productions comme par exemple la production de la pénicilline par les souches originales qui est passée sous forme de traces (1 à 20 mg/l) jusqu'à plus de 40 g/l (Anne et al., 1989).

### **8. Influence de la composition du milieu de culture sur la production d'antibiotiques :**

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des antibiotiques (Prescott *et al.*, 2003). En fait, plusieurs travaux rapportent que la nature des sources : de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de sels inorganiques, affecte fortement la production (Gesheva *et al.*, 2005 ; Mc Daniel *et al.*, 2001 ; Larpent et Sanglier, 1989).

#### **8.1. Influence de la source de carbone**

La disponibilité et le type de la source de carbone influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques (Martin et Demain, 1980; Spizek et Tichy, 1995).

Des sucres comme le glucose, les dextrans, le saccharose et l'amidon, constituent des substrats couramment utilisés dans les procédés fermentaires.

Mellouli *et al.*, 2003 ont constaté que la production des deux biomolécules actives par une nouvelle souche de *Streptomyces*, est étroitement liée à la nature de la source de carbone.

De plus, l'origine d'une même source de carbone peut également affecter la sécrétion des biomolécules par le microorganisme producteur. C'est le cas de l'antibiotique aminoglycoside, la néomycine dont la production (par *Streptomyces marinensis*) est fonction de l'origine céréalière de l'amidon utilisé comme source de carbone. (Adinarayana *et al.*, 2003).

Toutefois, certains substrats carbonés peuvent exercer un effet négatif sur la production (Sanchez et Demain, 2002). En effet, pour la plupart des microorganismes producteurs, une source de carbone rapidement assimilable comme le glucose, le glycérol, et même le citrate, exerce une action négative sur la production (Larpent et Sanglier, 1989; Martin, 1977). Dans ce cas, la production des antibiotiques commence après que la source de carbone favorisant une croissance rapide soit entièrement métabolisée.

#### **8.2. Influence de la source d'azote**

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influence nettement sur les rendements de production. La source d'azote peut être d'origine inorganique (sels d'ammonium, nitrates) ou organique simple (acides aminés) ou encore organique complexe (extrait de levure, extrait de malt, peptone, tryptone, caséine). Pour la source d'azote, la production de

## **REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

l'antibiotique SBR-22 par *Streptomyces* BT-408 a été étudiée sur plusieurs sources d'azotes inorganiques ou sous forme d'acides aminés. Il a été rapporté que c'est la source d'azote inorganique (nitrate d'ammonium) qui donne la meilleure production de la molécule SBR-22 (Sujatha *et al.*, 2005).

## I. LA SOUCHE BA4 DE STREPTOMYCES SP :

### 1. Origine de la souche

La souche d'actinomycètes étudiée (BA4) appartient au genre *Streptomyces*. Elle provient du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de Kouba. Elle a été isolée par la méthode des suspensions dilution (**Rapilly, 1968**) à partir d'un échantillon de sol de la palmeraie de Béni-Abbès sur milieu « chitine-vitamines B-agar » (CH. V.) (**Hayakawa et Nonomura, 1987**) additionné de streptomycine (10 µg/ml).

### 2. Conservation de la souche

La souche de *Streptomyces BA4* est conservée à 4°C par repiquages successifs sur milieu solide ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) (**Shirling et Gottlieb, 1966**) dont la composition est donnée en annexe.

## II. RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIBIOTIQUE DE LA SOUCHE BA4 SUR MILIEU SOLIDE :

### 1. Les microorganismes-cibles

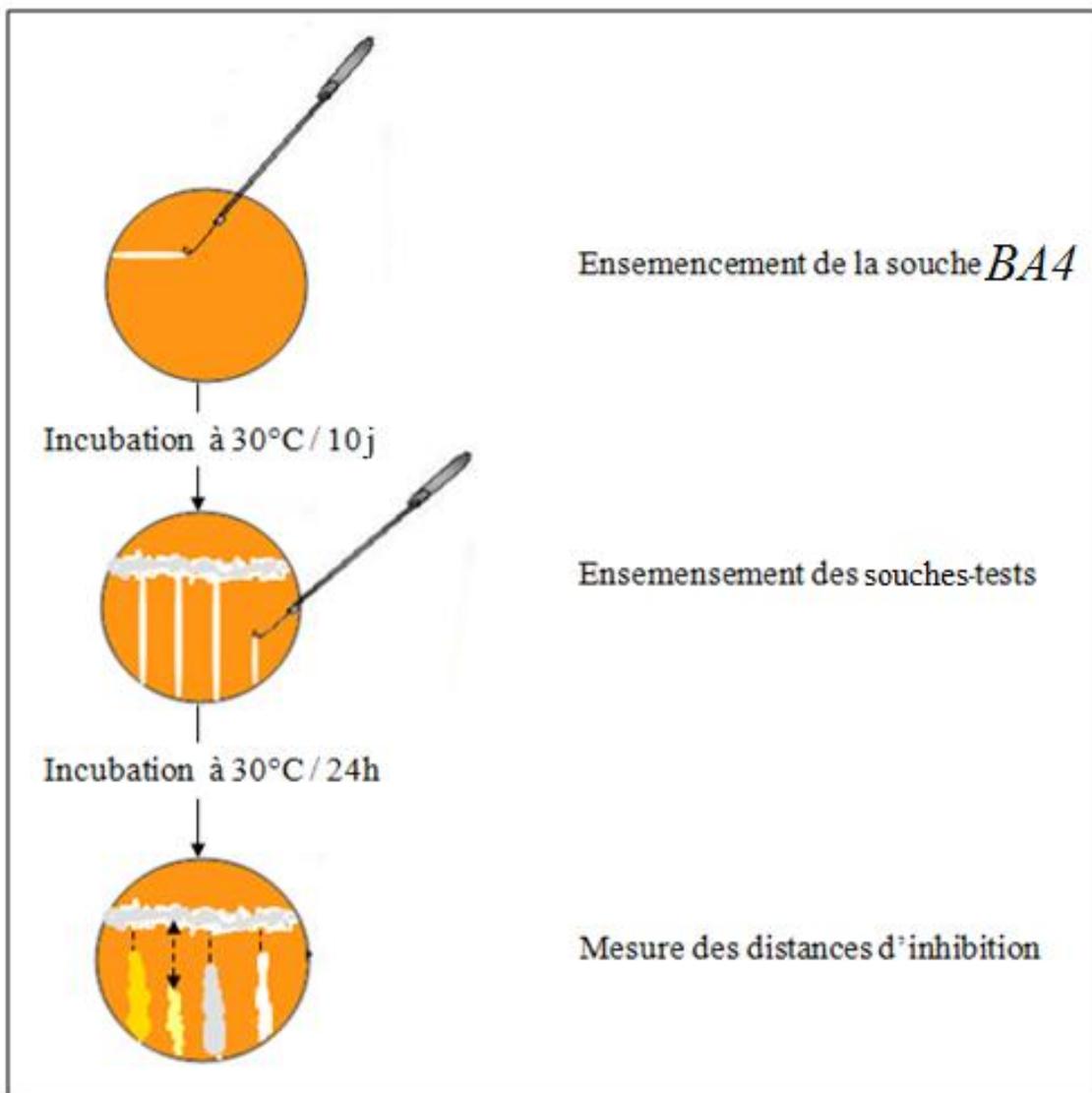
Sept souches bactériennes ont été utilisées dont quatre sont des bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Acinetobacter sp* (CLM), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) et *Klebsiella sp* (E40) et les deux autres bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

### 2. Milieu de culture

L'évaluation de l'activité antibactérienne de la souche BA4 de *Streptomyces* est réalisée sur milieu ISP2 solide car il permet une bonne croissance de l'actinomycète et des souches tests utilisées.

### 3. Technique des stries croisées

Cette technique (**Williston et al., 1947 ; Waksman, 1945**) consiste à ensemencer la souche de *Streptomyces* en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri. Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les bactéries-tests sont ensemencées perpendiculairement à l'actinomycète. L'effet de ce dernier est caractérisé par une inhibition partielle ou totale de la croissance des germes-tests. La lecture des résultats se fait en mesurant la distance d'inhibition entre la bordure de la souche-cible et celle de l'actinomycète, et ce après 24 h d'incubation. Les étapes de cette méthode sont représentées dans la figure 04.



**Figure 03** .Schéma illustrant la technique des stries croisées.

### **III. CINETIQUE DE CROISSANCE ET DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES EN MILIEUX LIQUIDES**

Les cinétiques de production des antibiotiques ont été menées sur un milieu synthétique pour étudier l'influence de quelques sources d'azote sur la production de l'activité antibiotique. Le but est de choisir la meilleure source qui permet une production optimale de molécules à activité antibiotique.

#### **1. Le milieu synthétique**

Le Milieu Synthétique (MS) (Bouras, 2006) a été choisi comme milieu de culture de base, dans lequel on fait varier la source d'azote, afin d'étudier son effet sur la production des antibiotiques. Une cinétique est suivie pendant 10 jours.

Ce milieu a été préparé à partir de : **NaCl** : 2g ; **KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>** : 0,5g ; **K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>** : 1g ; **MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O** : 0,2g ; **CaCO<sub>3</sub>** : 2g ; eau distillée : 1000 mL. pH 7,4.

Le **CaCO<sub>3</sub>** est connu par son action stimulatrice de la croissance et de la production d'antibiotique par un effet indirect en exerçant « un pouvoir tampon » sur les milieux (Isshiki *et al.*, 1989, Igarashi *et al.*, Lam *et al.*, 2000).

#### **2. Les sources d'azote :**

Afin de rechercher une source d'azote permettant une production optimale d'une activité antibactérienne nous avons choisi sept sources d'azote, selon qu'elle soit inorganique ou organique, souvent rencontrées dans la littérature et disponibles au niveau du laboratoire. Ce sont : la tryptone, la DL-alanine, l'extrait de levure, le sulfate d'ammonium, l'asparagine, le nitrate de calcium, et le nitrate d'ammonium à raison de 0,25% poids/volume.

#### **3. Obtention des pré-cultures**

Des pré-cultures sont préparées à partir de cultures mures âgées de 10 j et poussant sur milieu solide ISP<sub>2</sub>. Les spores (voir figure 04) sont ainsi récupérées et inoculées dans des tubes à essais contenant chacun 3 ml de milieu liquide. Les suspensions sont homogénéisées au vortex puis les tubes sont incubés à 30°C pendant 2 j. la quantité inoculée est de 1 ≈ 0,2 mg pour 100 ml de milieu de culture.

Après 2 jours d'incubation sur un agitateur rotatif (30°C, 250 rpm), cette pré-culture est utilisée pour ensemercer le même milieu de production (en fioles d'Erlenmeyer).

#### **4. Ensemencement de la souche BA4 en fioles d'Erlenmeyer**

Les cultures de production ont été réalisées en fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml (soit 20 % du volume de l'Erlenmeyer) de milieu liquide (milieu synthétique MS + source d'azote). Chaque Erlenmeyer estensemencé avec 3 ml de la pré-culture et mis en incubation à 30° C sur un agitateur rotatif à 250 rpm pendant 10 jours. Chaque expérience est réalisée en double. Des prélèvements sont effectués en cours de fermentation, toutes les 24 h pour réaliser les différentes mesures.

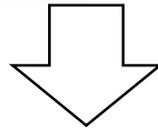
#### **5. Suivi de la production d'antibiotiques : Méthode des puits de diffusion**

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Acinetobacter sp (CLM)*, *Staphylococcus aureus (ATCC 25923)* et *Bacillus subtilis (ATCC 6633)*.

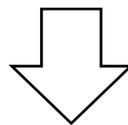
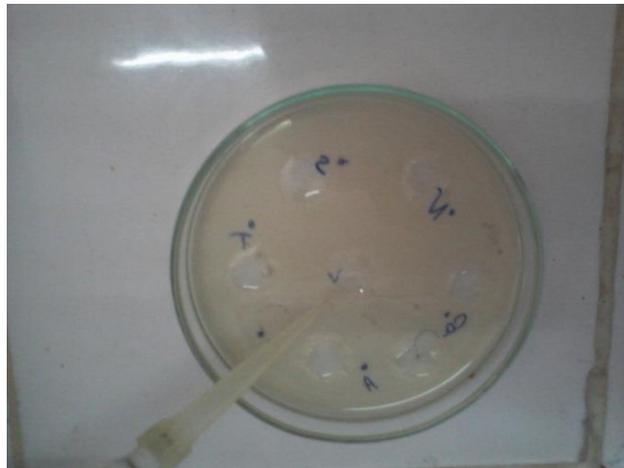
Dans cette méthode, le milieu Muller Hinton dont la composition est donné en annexe, contenant uniquement 12g/l d'agar (pour faciliter la diffusion des antibiotiques) en surfusion, est pré-ensemencé avec le germe-cible avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du milieu, des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10mm de diamètre (7 puits par boîte)(voir figure 05).

Une quantité de 100µl du surnageant de culture à analyser, est prélevée stérilement à l'aide d'une micropipette (embout stérile) puis introduite dans les puits. Les boîtes sont mises 2 h à 4°C pour laisser diffuser les substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubé à 30°C.

La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits après 24h.



Après solidification du milieu,  
des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce de 10mm de diamètre



Introduire 200µl du surnageant à analyser dans chaque puits.

**Figure 4.** Méthode des puits de diffusion

## **6. Mesure de la biomasse et du PH**

L'évolution de la biomasse est suivie par la mesure du poids sec pendant les jours de prélèvement. Pour cela, les 2ml de culture prélevée sont centrifugés à 5000 rpm pendant 10 mn dans des tubes Eppendorf préalablement tarés. Le surnageant est récupéré et va servir pour suivre l'évolution du pH du milieu grâce à un pH mètre. Le culot (biomasse) est lavé avec de l'eau distillé.



Surnageant : pour la mesure du ph

Culot : pour la mesure de la biomasse

**Figure 5.** Culture prélevée après centrifugation à 5000 rpm.

## **7. Mesure de la biomasse**

Les tubes contenant seulement le culot sont incubés à 100°C pendant 24h puis pesés pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare.

## **IV. EXTRACTION DES ANTIBIOTIQUES ET ANTIBIOGRAMME**

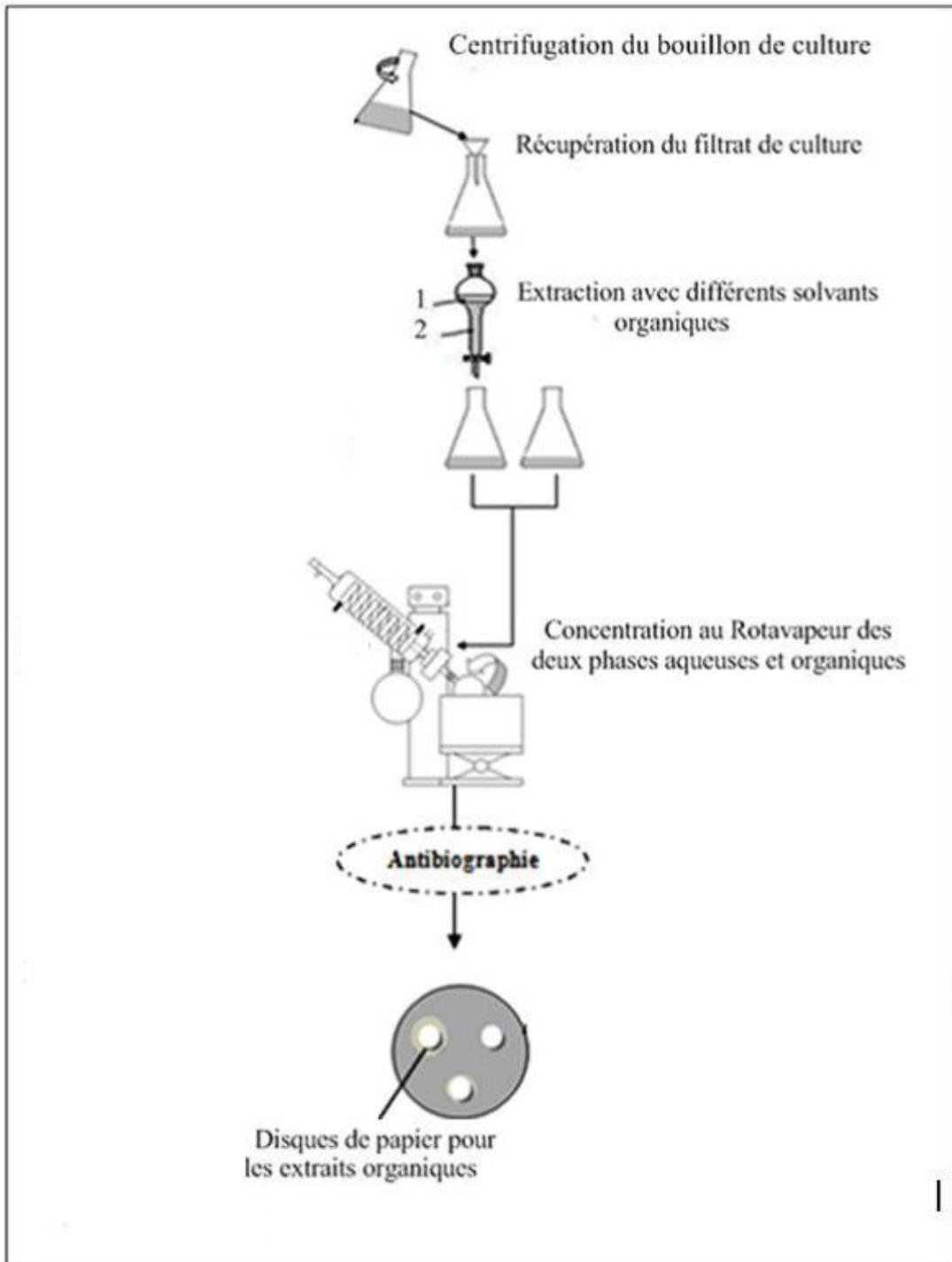
### **1.Extraction à partir des filtrats de culture**

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant organique non miscible à l'eau. Trois solvants de différentes polarités sont testés ; le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol.

Le bouillon de culture (200 ml) est centrifugé à 5000 rpm pendant 15 mn, puis filtré. Un volume de 35 ml du filtrat est extrait avec un volume égal en solvant dans une ampoule à décanter de 100 ml.

La phase organique est récupérée puis déshydratée par passage à travers un papier-filtre (whatman n°1) contenant du sulfate de sodium anhydre en poudre afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles.

La phase organique est alors concentrée à sec au rotavapeur. L'extrait brut organique est reprise dans un minimum de solvant (méthanol) et testé par antibiographie pour déterminer son activité antibiotique. Cette expérience nous permet ainsi de choisir le meilleur solvant d'extraction afin de l'utiliser pour les futures extractions de l'activité antibiotique.



**Figure 6.** Schéma général d'extraction, et de révélation des activités antibiotiques.

1 : Phase organique ; 2 : phase aqueuse.

## **2. Extraction à partir du mycélium**

Le mycélium récupéré après centrifugation et filtration de la culture est lavé 3 fois à l'eau distillée par centrifugation. Le culot mycélien est immergé avec du méthanol dans une fiole fermée. Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante. L'extrait méthanolique est ensuite obtenu par filtration sous vide à travers le papier Whatman puis concentration à sec au rotavapeur. Les activités antibactériennes sont recherchées par la méthode des disques de papier.

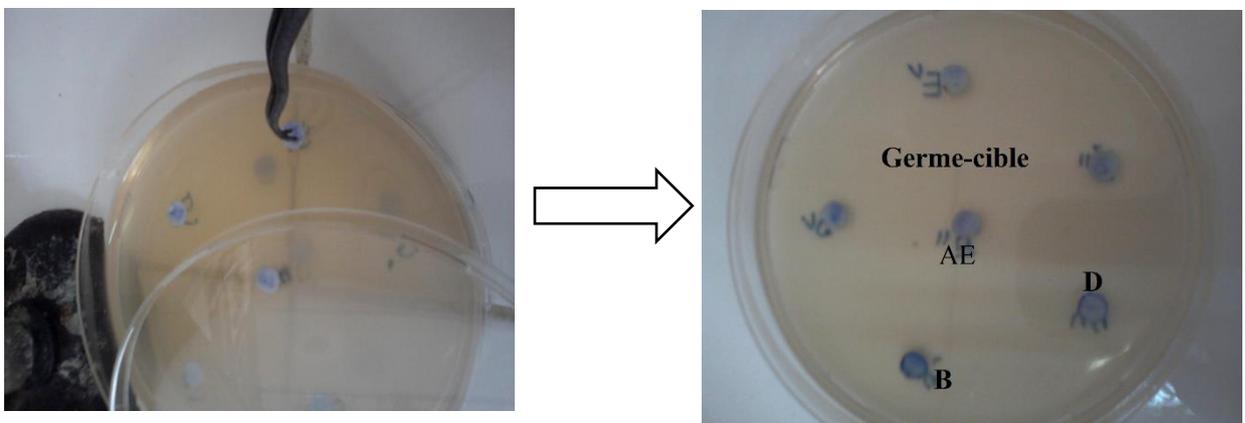
## **3. Détermination de l'activité antibactérienne des extraits par antibiographie**

Les différents extraits organiques obtenus à partir du mycélium ou des filtrats de culture, sont testés pour leurs activités bactériennes. Pour cela, la méthode de diffusion des disques de papier est utilisée.

## **4. Méthode de diffusion des disques de papier**

Cette expérience nous permettra de connaître le meilleur solvant d'extraction pour la suite de notre travail. Les extraits obtenus sont testés contre les microorganismes-cibles choisis : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) et *Acinetobacter sp* (CLM).

Des disques en papier de 6 mm de diamètre sont imbibés par 30 ul d'extrait organique, puis séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu Muller Hinton (12 g/l d'agar), préalablement ensemencé par le germe-test.



**Figure 7.** Méthode des disques en papier. **AE** : Extrait à l'acétate d'éthyle, **B** : Extrait au *n*-butanol, **D** : Extrait au dichlorométhane.

## **V. LA MISE EN EVIDENCE DES ANTIBIOTIQUES PAR BIOAUTOGRAPHIE :**

La bioautographie consiste en une migration des extraits d'antibiotiques sur des plaques de gel de silice ( CCM ) puis de faire non pas une révélation chimique mais une révélation microbiologique en coulant sur la plaque un milieu de culture ensemencé par le germe-cible.

Ce dernier se développera sur toute la plaque sauf au niveau de la zone de migration des antibiotiques dont on pourra déterminer le Rf (rapport frontal).

Les extraits utilisés ne sont pas limités à ceux obtenus avec le meilleur solvant d'extraction mais concernant l'ensemble des solvants utilisés. Ce choix est motivé par le fait que des solvants de polarités différentes pourraient extraire des antibiotiques différents.

### **1. Préparation des plaques du gel de silice (voir figure 8)**

Les plaques de gel de silice sont préparées comme suit :

- Mélanger 50 ml de gel de silice G60 (Merck) dans 100 ml d'eau distillée dans un Erlenmeyer de 500ml.
- Agiter fortement et brièvement (environ 30 s)
- la pâte est étalée d'une manière uniforme sur des plaques en verre propre (20 X 20 cm ou 10 X 10 cm) en utilisant l'étaleur de Dessaga réglé de manière à obtenir une couche de 0,25 mm d'épaisseur.
- Les plaques sont séchées une heure à 40°C avant d'être utilisées.

### **2. Dépôt des échantillons et développement des plaques**

A l'aide d'une microseringue, les échantillons (extraits de filtrats de cultures) sont déposés sur la plaque sous forme de spots par petites fractions (50 µl par spot) à 3 cm de la bordure inférieure de la plaque.

Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été préalablement saturée avec le système de solvant d'élution EAE : Ethanol-Ammoniaque-Eau (80/10/10, en volume).

Après développement et au moment où le front du solvant a parcouru une distance d'environ 15 cm à partir du dépôt, les plaques sont retirées des cuves, séchées à température ambiante puis observées à l'œil nu puis aux U.V. afin de délimiter les taches présentant une absorbance à 254 nm ou une fluorescence à 365 nm, ce qui permettra de localiser les fractions antibiotiques actives des non actives.

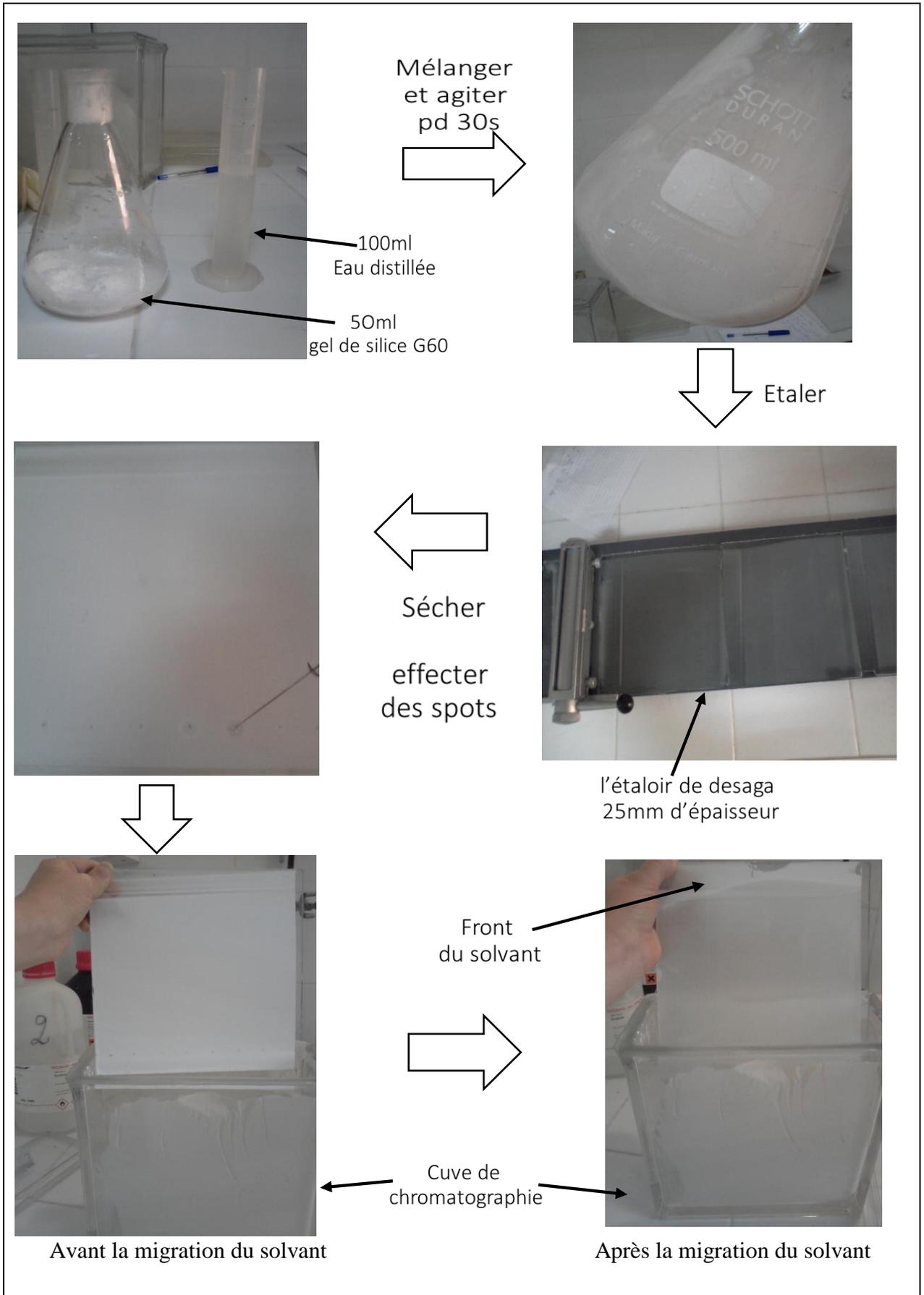


Figure 08 : Préparation des plaques du gel de silice et chromatographie.

### **3. Révélation microbiologique ou bio-autographie**

La révélation microbiologique est effectuée selon la méthode de Bétina (1973). Elle permet de détecter les taches actives présentes dans les extraits en déterminant leur nombre ainsi que leur Rf (Rapport Frontal), les microorganismes-cibles choisis sont les suivants :

*Acinetobacter sp (CLM)*, *Staphylococcus aureus (ATCC 25923)* et *Bacillus subtilis (ATCC 6633)*.

Les plaques sont séchées sous hotte aérée durant une nuit, afin d'éliminer toute trace de solvant susceptible d'empêcher la croissance du microorganisme-cible lors de la bioautographie.

Chaque plaque est ensuite placée horizontalement (et surélevée en utilisant des baguettes en verre) dans une boîte en polyéthylène (22 X 24 cm) dont l'atmosphère est rendue humide grâce à du papier joseph imbibé d'eau stérile (pour éviter la dessiccation du milieu gélosé au cours de l'incubation). Le dispositif est ensuite stérilisé sous UV à 254nm durant 45min.

Par la suite, 50 ml du milieu Muller Hinton (à 7 g/l d'agar) préalablement ensemencé avec le germe-cible est réparti uniformément sur la plaque de gel de silice. Après solidification du milieu, les boîtes sont mises à 4°C pendant 2 h (diffusion des antibiotiques) puis incubées à 30°C. La lecture se fait après 24 h. Les zones d'inhibition des taches actives sont alors observées et le Rf des antibiotiques est calculé selon la formule suivante :

$$\text{Rf} = \frac{\text{Distance de migration entre dépôt et tache active}}{\text{Distance de migration entre dépôt et front du solvant}}$$

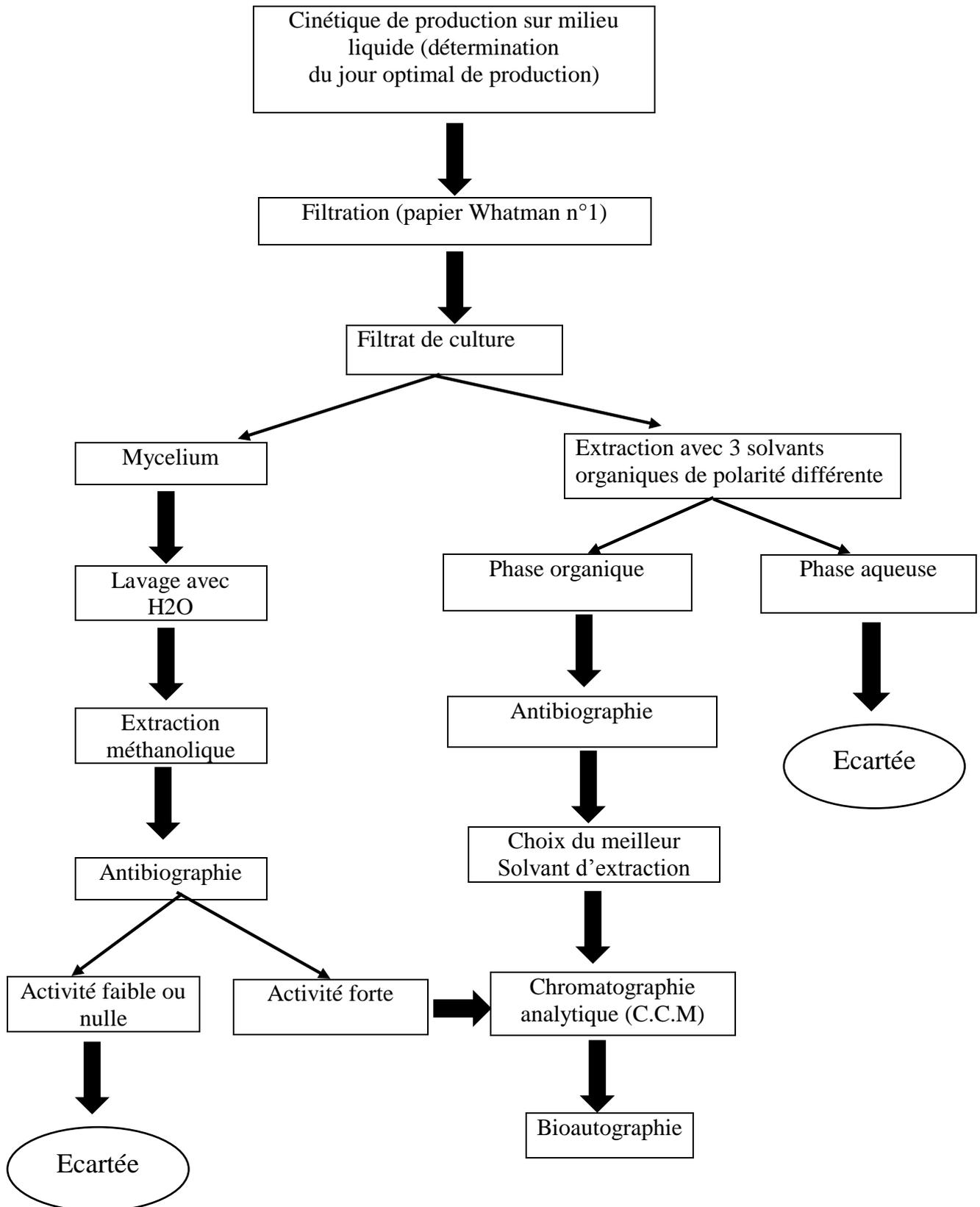


Figure 09 : Protocole général de production et d'extraction des antibiotiques

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2005).** - Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Med. Myco.*, **15**, 211- 219.
- Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N. (2006).** - Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp., AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.*, **52**, 373-382.
- Badji B., Mostafaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E., Tillequin F. (2007).** - Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J. Ind. Microbiol.*, **34**, 403-412.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012).** Holt J.H., Kreig N.R, Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Boudjella H. (1994).** – Influence des milieux de cultures, des antibiotiques et du pré-traitement des sols Sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177p.
- Boujdella H. (2007).** – Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique El-Harrach. 206 p.
- Breülland J., Lemoine A. Michel G. et Olle J. (1974).** –Etude des actinomycètes aérobies Rencontrés dans l'air de Toulouse. *Rev. Inst. Pasteur*, Lyon, Fr., **7(3)**, 269-278.
- Boughachiche F., Reghioua G., Gulmi L., Zerizer H., Kitouni M., Boudemagh A. and Bulahrouf A. (2005).**-Production et caractérisation préliminaire des antibiotiques isolés d'une actinomycète isolée de Sebkhah de Ain M'lila (Algérie). *Antibiotiques.*, **7**, 234-238.
- Cross T. (1981).** –Aquatic Actinomycetes : a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. *J. Appl. Bacteriol.*, **50**, 397-423.
- Couch J. N. and Bland C. E. (1974).** – Family IV. Actinoplanaceae. *In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8 th ED., Buchanan R. E. and Gibbon N. E. (Eds). Williams and Wilkins C. O. Baltimore, 706-723.

**Dagnra A.Y. , Akolly K., Gbaddoe A., Aho K. and David M. (2007).**- Emergence des souches de salmonelles multirésistantes aux antibiotiques à Lomé(Togo). *Médecine et maladies infectieuses.*, 37 , 266-269.

**Dommergues Y. et Mangenot F. (1970).** – Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie (Eds.), Paris.

**Goodfellow M., Williams S. T. and Mordarski M. (1984).** –Introduction to and importance of the actinomycetes. In : « The biology of the actinomycetes », Goodfellow M.Williams S. and Mordarski M. (Eds.). London: Academic Press, PP. 16.

**Goodfellow M. and Williams S.T. (1983).** – Ecology of Actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.*, 37, 189-216.

**Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (1994).** *In: Bergey's manual of determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

**Ishizawa S. and Araragi M. (1976).** –Composition of actinomycetes population in soil. *In: Actinomycetes, the boundary microorganisms.* Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.

**Lacey J. (1997).** –Actinomycetes in compsts. *Ann. Agric. Environ. Med.*, 4, 113-121.

**Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002).** - New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, 55, 696-701.

**Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002).** – New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 – I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, 55, 696-701.

**Locc, R. and Sharples, G. P. (1984)** Morphology. *In : The biology of Actinomycetes.* Goodfellow, M., Mordarski, M. and Williams, S. T. (Eds.) Academic Press, London., UK, 165-199.

**Lechevalier M.P., (1981).** – Ecological associations involving actinomycetes. *In: Actinomycetes.* Shaal and Pulverer (Eds.). *Zbl. Bakt. Suppl.*, 11, 159-166.

**Poirel L.,Marque S., Heritier C., Segonds C., Chabanon G., Nordmann P . (2005).**-OXA-58,a novel class D beta-Lacetamase involved in resistance to carbapenems in *Acinetobacter baumannii*.*J.Antimicrob.Chemother.*55, 680-685.

- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A. (2003).** Microbiologie. 2<sup>ème</sup> édition. DeBoeck. Bruxelles. 1164 p. ISBN 2-8041-4256-6.
- Räty K., Kantola A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P. (2002).** – Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*, 293, 115-122.
- Roberts M.C.(1998).** – Antibiotic resistance mechanisms in bacteria of oral and upper respiratory origin . *Int. J. Antimicrob . Agents*.9,255-267 .
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L., Lefebvre G. et Germain P. (1998).** – Les sols des oasis du sahara Algérien, sources des actinomycetes rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, **9**, 147-153.
- Schwarz S., Kehrenberg C. and walsh T.R. (2001).** - Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents*,**17**, 431-437.
- Skurnik, a., H. Ammari, r. Ruimy, d., Andremon, d. Mazel, a.m. Guerout, f. Assaous,K.rahah., (2007).**- Antibiotic resistance conferred by a class i integron and sxt element in different *Vibrio cholerae* o-serotype isolated in algeria . *Eccmid*, Munich, 2007
- Tagajdid M.R., Boumhil L., Iken M., Adnaoui M. et Benouda A. (2008).**-Etude de la résistance des souches de *Escherichia coli* isolées dans les urines aux fluoroquinolones et aux céphalosporines de troisième génération. *J. Med. Mal.*, **15**, 10-15.
- Tenover F. C. (2006).**- Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Infect. Control.*, 34, S3-10.
- Vandamme E.J.(1985).**– Biotechnology of industrial antibiotics. *Drugs and pharmaceutical sciences*. Vol. 22. New-york. Marcel Dekker. P 808.
- Vessey J.K. (2003).**-Plant growth promoting rhizobacteria as biofertilizers. *Plant soil.*, 255,751-586.
- Watve M.G., Tickoo R., Jog M.M. and Bhole B.D. (2001).** – How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces* ? *Arch. Microbiol.*, **176**, 386-390.
- Weill F.X. (2008).**- Salmonella ;épidémiologie,typage et résistance aux antibiotiques. *Revue Francophone des Laboratoires*. 38(400), 38-48.

**Zitouni A. (2005).** – Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix sp.* 103. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 230 p.

**Zhao ,J.J., Hua,Y.J., Sun, D.G., Meng,X.X., Xiao, H.S., and Ma, X. (2006).** -  
Genome-wide microRNA profiling in human fetal nervous tissues by oligonucleotide microarray. *Childs Nerv.*

## **I. Composition des milieux de culture**

### **1. Milieu solide ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)**

Extrait de Levure : 4 g.

Extrait de malt : 10 g.

Glucose : 4 g.

Agar : 20 g.

Eau distillée : 1000 ml.

pH = 7,2

### **2. Milieu synthétique : (Lamari *et al.*, 1999 ; 2000)**

(NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> : 2 g.

MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O : 0,2 g.

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> : 1 g.

NaCl : 2 g.

CaCO<sub>3</sub> : 2 g.

Agar : 20 g.

Eau distillée : 1000 ml.

pH = 7,2

### **3. Milieu Muller Hinton (Marchal *et al.*, 1987)**

Extrait de viande : 2 g.

Hydrolysate de caséine : 17.5 g.

Amidon : 1.5 g.

Agar : 12 g. (pour la méthode des puits et celle d'antibiographie) et 7 g (pour la méthode de bioautographie).

Eau distillée : 1000 ml.

pH = 7,4

## II. Quelques exemples d'antibiotiques sécrétés par le genre

**Streptomyces** (Christopher, 2003).

Antibiotique	Espèce productive	Année	Activité (Site ou mode d'action)
<i>Streptomycine</i>	<i>Streptomyces griseus</i>	1944	Antibactériennes à G- (Synthèse des protéines)
<i>Chlortétracycline</i>	<i>S. aureofaciens</i>	1946	Antibactériennes (Synthèse des protéines)
<i>Chloramphénicol</i>	<i>S. venezuelae</i>	1947	Antibactériennes (Synthèse des protéines)
<i>Néomycine</i>	<i>S. fradiae</i>	1949	à large spectre (Synthèse des protéines)
<i>Oxytétracycline</i>	<i>S. rimosus</i>	1950	Antibactériennes (Synthèse des protéines)
<i>Erythromycine</i>	<i>S. erythreus</i>	1952	Antibactériennes à G- (Synthèse des protéines)
<i>Tétracycline</i>	<i>S. texasi</i>	1953	à large spectre (Synthèse des protéines)
<i>Spiramycine</i> (=Rovamycine)	<i>S. ambofaciens</i>	1954	Antibactériennes à G+et G-, chlamydie, mycoplasmes et taxoplasmes
<i>Oléandomycine</i>	<i>S. antibioticus</i>	1954	Antibactériennes (Synthèse des protéines)
<i>Novobiocine</i>	<i>S. niveus</i>	1955	Antibactériennes (DNA gyrase)
<i>Fosfomycines</i>	<i>S. fradiae</i>	1955	Antibactériennes (peptidoglycane)
<i>Amphotéricine B</i>	<i>S. nodosus</i>	1956	Champignons (membrane cellulaire)
<i>Vanacomycine</i>	<i>S. orientalis</i>	1956	Antibactériennes à G- (Synthèse des protéines)
<i>Rifamycine</i>	<i>S. mediterranei</i>	1957	Tuberculose (Synthèse des protéines)
<i>Kanamycine</i>	<i>S. kanamyceticus</i>	1958	Antibactériennes à G- (Synthèse des protéines)
<i>Pristinamycine</i>	<i>S. pristinae</i>	1962	Antibactériennes (Synthèse des protéines)
<i>Kasugamycine</i>	<i>S. kasugaensis</i>	1965	Bactéricide et fongicide (Synthèse des protéines)
<i>Polyoxine B et D</i>	<i>S. cacaoi</i> var. <i>Asoensis</i>	1965	Fongicides (Inhibiteur la synthèse de la chitine synthase)
<i>Mildiomyicine</i>	<i>S. rimofaciens</i>	1978	Antibactériennes à G- (Synthèse des protéines)
<i>Geldanamycine</i>	<i>S. hygroscopicus</i> var. <i>geldanus</i>	1984	Bactéricide et fongicide (Synthèse des protéines)
<i>Platensimycine</i>	<i>S. platensis</i>	2006	Antibactériennes à G- (Synthèse des acides gras)

### III. Quelques caractéristiques des souches- tests pathogènes.

	Souche test	Famille	La maladie causée
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Diarrhée, méningites, ou septicémies. gastro-entérite infantile, Infections urinaires.
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Infections respiratoires (pneumonies Abscès, pleurésies), ou rhinopharyngées (bronchopneumonies, angines), infections intestinales.
	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Enterobacteriaceae</i>	Gastro-entérite aiguë fébrile, septicémie, infection abcédée. Fièvre typhoïde (Fièvre entérique)) intoxications alimentaires.
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Pseudomonadaceae</i>	Les infections nosocomiales : infection pulmonaire, infection de la peau, tissus, mous, infection du site opératoire, infection urinaire tous sites confondus infections communautaires infection oculaires : kératites, abcès de la cornée ; endophtalmie, Otites.
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Bacillaceae</i>	intoxication alimentaire.
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Staphylococcaceae</i>	Syndrome de choc toxique, infections cutanéomuqueuses telles que les folliculites, impétigo, furoncles, anthrax, panaris, cellulites ou les sinusites et les otites, infections urinaires.

#### IV. Profils de résistance des bactéries-cibles utilisées

(In : Touati et al., 2006 ; Messai et al.,2008).

Microorganismes	Origine	Résistance à :	Sensibilité à :
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E40)	Lait*	AMX-CEP-FEPCTX-CAZ-TIC-PIP-GEN-TOB-SXT	AMC-ATM-TCC-CXC-C
<i>Salmonella enterica</i> (E32)	Sang*		FOX-TZP-AMC-CXC -TCC-SXT-C
<i>Eschrichia coli</i> (E52)	Urine*		FOX-TZP-TCC-CXC-SXT
<i>Eschrichia coli</i> (ATCC 25922)	ATCC	Sensible à tous les antibiotiques sus-indiqués sauf l'acide nalidixique	
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633)	ATCC	NEO	GEN-K-VAN-PEN-CAR-CYC-CHL-C-OXY-ERY-SPI-RIF-SSS

**Légende :** AMS : Amoxicilline+ clavulanate, AMX : Amoxicilline,

ATM : Aztréonam, CAR : Carbénicilline, CAZ : Ceftazidime, C : Chloramphénicol,

CHL : Chlorotétracycline, CTX : Céfotaxime, CXC : Céfotaxime-Clavulante,

CYC : Cyclosérine, ERY : Erytromycine, FEP : Céfépime, FOX : Céfoxitine,

GEN : Gentamicine, NEO : Néomycine, OXY : Oxytétracycline, RIF : Rifampicine,

PEN : Pénicilline-G, PIP : Pipéracilline, K : Kanamycine, SPI : Spiramycine,

SSS : Sulfamide, TCC :Ticarcilline + Clavulante, TIC : Ticarcilline, TZP :

Pipéracilline + Tazobactam, VAN :Vancomycine, TOB :Tobramycine.

ATCC : American Type Culture Collection.

\*Source hospitalière.