

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

Ministère de l'enseignement supérieur et de la recherche scientifique



وزارة التعليم العالي والبحث العلمي



BADJI MOKHTAR –ANNABA UNIVERSITY  
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR – ANNABA

جامعة باجي مختار  
عنابة

FACULTE DES SCIENCES

Département de Biochimie

MEMOIRE

Présenté en vue de l'obtention du diplôme de

**Magister en Microbiologie**

Option : *Microbiologie de l'eau*

**Thème :**

**RECHERCHE DES SOUCHES D'ACTINOMYCETES  
PRODUCTRICES DE MOLECULES ANTIBACTERIENNES  
"CAS DES EAUX DU LAC OUBEIRA D'EL KALA"**

Présenté par :

**LOUCIF Lotfi**

Devant le jury :

|                      |                      |     |           |
|----------------------|----------------------|-----|-----------|
| Président            | Mme. BOUTEFNOUCHET N | Pr. | U. Annaba |
| Directeur de mémoire | Mme. KIRANE D        | M.C | U. Annaba |
| Examineur            | Mme. CHETTIBI H      | M.C | U. Annaba |
| Examineur            | Mr. MERAD T          | M.C | U. Annaba |

Septembre 2006

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

" يا ربي لك الحمد كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك "

# DÉDICACE

Avant tout, nos sincères remerciements reviennent à Allah le tout puissant pour tous ses dons.

A ma chère regrettée grand-mère

Je dédie ce modeste mémoire qui est le fruit de longues années de travail à la fontaine d'amour qui ne s'arrête pas de donner ma chère mère.

Pour mon très cher père qui m'a suivi le long de ce chemin, qui n'a jamais cessé de contribuer à ma réussite et mon bonheur et j'espère qu'il sera fier.

A mes frères : Soufiane, Fouzi, Riadh et Souhaib.

A mes sœurs : Rahma, Amira et Malak.

A toute ma famille.

A Monsieur le Directeur des activités culturelles et sportives de

l'université de Annaba Mr : AGOUNI Mabrouk.

A tous mes amis.

LOTFI

# **REMERCIEMENTS**

Remerciant tout d'abord le bon dieu tout puissant de m'avoir donné la force de réaliser ce travail.

Je tiens à remercier :

Profondément, mon encadreur Dr KIRANE D, maître de conférences à l'université de Annaba pour le privilège et la confiance qu'elle m'accordés durant l'étude pratique, et de m'avoir accepté de diriger ce travail avec compétence, pour sa disponibilité, son aide, sa patience, ainsi que pour ses précieux conseils ; je ne peux, madame, que sincèrement vous exprimer mon respect et ma gratitude.

Egalement, le Pr BOUTEFNOUCHET N, de m'avoir fait l'honneur de présider le jury auquel est soumise mon étude.

Le Dr CHETTIBI H, maître de conférences a l'université de Annaba et Dr MERAD T, maître de conférences à la même université, de bien vouloir examiner et juger ce mémoire.

Infiniment et avec beaucoup de reconnaissances, le Pr ZOUIOUECH L, membre du conseil scientifique de la faculté des science à l'université de Annaba, pour son aide et la mise à ma disposition du matériel de son laboratoire et ses étudiantes en post-graduation surtout Nedjma.

Le Pr KASSEH LAOUAR M, Médecin chef du laboratoire de microbiologie médicale du C.H.U. Batna pour son aimable fourniture des souches de références ATCC.

Je ne terminerais pas sans remercier mes collègues du laboratoire surtout BENDJAMA E pour leur aide morale et leur encouragement.

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



# Liste des Figures

| <b>Figure</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|---------------|--|-------------|
| <b>01</b>     | Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes.                                      | <b>13</b>   |
| <b>02</b>     | Clé d'identification des principaux genres des Actinomycètes.                                | <b>20</b>   |
| <b>03</b>     | Les différentes voies de transmission des Staphylocoques.                                    | <b>25</b>   |
| <b>04</b>     | Les principales infections à Staphylocoque.  | <b>27</b>   |
| <b>05</b>     | Localisation du genre <i>Pseudomonas</i> au niveau de la microflore normal de l'être humain. | <b>32</b>   |
| <b>06</b>     | Quelques mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries.            | <b>47</b>   |
| <b>07</b>     | Les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries.             | <b>49</b>   |
| <b>08</b>     | Situation géographique du lac Obéira d'El Kala.  | <b>50</b>   |
| <b>09</b>     | Protocole du test d'activité antibactérienne sur milieu liquide.                             | <b>77</b>   |
| <b>10</b>     | Schéma général de production, d'extraction et de purification des antibiotiques.             | <b>82</b>   |
| <b>11</b>     | Nombre de souches isolées à partir de chaque échantillon mère.                               | <b>92</b>   |
| <b>12</b>     | Nombre de souches isolées sur chaque milieu de culture.                                      | <b>94</b>   |
| <b>13</b>     | Fiche des résultats de l'API 20E de la souche de référence Z ATCC.                           | <b>97</b>   |
| <b>14</b>     | Fiche de résultats du système API Staph de la souche de référence X <sub>1</sub> (MRSA).     | <b>98</b>   |

|           |  |            |
|-----------|--|------------|
| <b>15</b> | Fiche de résultats du système API Staph de la souche de référence X <sub>2</sub> .   | <b>98</b>  |
| <b>16</b> | Fiche des résultats du système API 20NE de la souche de référence Y.   | <b>99</b>  |
| <b>17</b> | Antibiogramme de la souche de référence cible X <sub>1</sub> .   | <b>100</b> |
| <b>18</b> | Antibiogramme de la souche de référence cible X <sub>2</sub> .   | <b>101</b> |
| <b>19</b> | Antibiogramme des deux souches de références <i>S.aureus</i> X <sub>1</sub> et X <sub>2</sub> .  | <b>102</b> |
| <b>20</b> | Antibiogramme de la souche de référence cible y1.  | <b>103</b> |
| <b>21</b> | Antibiogramme de la souche de référence cible Z.   | <b>104</b> |
| <b>22</b> | Zones d'inhibition de la souche de référence <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>1</sub> ATCC (MRSA).                                      | <b>106</b> |
| <b>23</b> | La cinétique de production d'antibiotique de la souche 10 sur les deux milieux de cultures liquides avec l'évolution du pH.                | <b>109</b> |
| <b>24</b> | Zones d'inhibition des extraits du filtrat et du mycélium.   | <b>111</b> |
| <b>25</b> | Séparation des produits de l'extrait du dichlorométhane par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes de solvants. | <b>112</b> |
| <b>26</b> | Séparation des produits de l'extrait du dichlorométhane par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes de solvants. | <b>113</b> |
| <b>27</b> | Mode opératoire de la galerie API 20 E.  | <b>118</b> |
| <b>28</b> | fiche de résultat du système API 20 E.   | <b>119</b> |
| <b>29</b> | Mode opératoire de la galerie Api Staph.   | <b>119</b> |

|           |   |            |
|-----------|---|------------|
| <b>30</b> | Fiche de résultat du système API Staph. | <b>120</b> |
| <b>31</b> | Mode Opérateur de la Galerie API20NE.   | <b>120</b> |
| <b>32</b> | Fiche de résultat du système API 20NE.  | <b>121</b> |

# Liste des Tableaux

| <b>Tableau</b> | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|----------------|---|-------------|
| <b>01</b>      | Différents chimiotypes rencontrés chez les Actinomycetes.                               | <b>16</b>   |
| <b>02</b>      | Toxines et enzymes produites par les Staphylocoques.                                    | <b>26</b>   |
| <b>03</b>      | Maladies causées par les staphylocoques.  | <b>28</b>   |
| <b>04</b>      | Histoires d'antibiotiques et de résistances bactériennes à propos de <i>S. aureus</i> . | <b>29</b>   |
| <b>05</b>      | Les infections causées par <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .                              | <b>33</b>   |
| <b>06</b>      | La résistance de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> aux antibiotiques.                       | <b>35</b>   |
| <b>07</b>      | profil biochimique : <i>Escherichia coli</i> .  | <b>36</b>   |
| <b>08</b>      | propriétés des <i>E.coli</i> responsables de diarrhée.                                  | <b>38</b>   |
| <b>09</b>      | Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Berdy et al., 1987).  | <b>41</b>   |
| <b>10</b>      | Les différentes familles d'antibiotiques.   | <b>42</b>   |
| <b>11</b>      | Résumé des mécanismes d'action des antibiotiques.                                       | <b>44</b>   |
| <b>12</b>      | valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>staphylococcus sp.</i>   | <b>72</b>   |

| <b>Tableau</b> | <b>Titre</b>  | <b>Page</b> |
|----------------|---|-------------|
| <b>13</b>      | valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour <i>Pseudomonas aeruginosa</i> . | <b>73</b>   |
| <b>14</b>      | valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les Entérobactéries.            | <b>73</b>   |
| <b>15</b>      | paramètres physicochimique des échantillons mères.  | <b>84</b>   |
| <b>16</b>      | Aspect macroscopique des colonies suspectes (T°C : 28°C).                                   | <b>85</b>   |
| <b>17</b>      | Aspect microscopique des colonies suspectes.  | <b>88</b>   |
| <b>18</b>      | Aspect macroscopique des souches de références cible utilisées.                             | <b>95</b>   |
| <b>19</b>      | Aspect microscopique des souches de référence cible utilisées.                              | <b>96</b>   |
| <b>20</b>      | Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible X <sub>1</sub> .               | <b>100</b>  |
| <b>21</b>      | Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible x2.                            | <b>101</b>  |
| <b>22</b>      | Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible Y.                             | <b>103</b>  |
| <b>23</b>      | Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible Z.                             | <b>104</b>  |

| <b>Tableau</b> | <b>Titre</b>   | <b>Page</b> |
|----------------|--|-------------|
| <b>24</b>      | Résultats du test de la production du métabolite antibactérien sur milieu solide.      | <b>105</b>  |
| <b>25</b>      | Résultats du test de la production du métabolite antibactérien sur milieu liquide.     | <b>106</b>  |
| <b>26</b>      | Résultats de la cinétique de production de la souche10 sur le milieu ISp2.             | <b>107</b>  |
| <b>27</b>      | Résultats de la cinétique de production de la souche10 sur le milieu ISp1.             | <b>108</b>  |
| <b>28</b>      | Résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits à partir du filtrat.       | <b>110</b>  |
| <b>29</b>      | Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du mycélium. | <b>111</b>  |
| <b>30</b>      | Résultats du test de l'activité des produits de l'extrait du dichlorométhane.          | <b>114</b>  |
| <b>31</b>      | Tableau de lecture du système API 20 E.  | <b>122</b>  |
| <b>32</b>      | Tableau de lecture du Système API Staph.   | <b>123</b>  |
| <b>33</b>      | Tableau de lecture du Système API 20 NE.   | <b>124</b>  |
| <b>34</b>      | Propriétés physiques des solvants organiques utilisés.                                 | <b>125</b>  |

# Liste des Schémas

| Schéma | Titre   | Page |
|--------|---|------|
| 01     | Localisation des différents points du prélèvement.  | 51   |
| 02     | Technique de Préparation des dilutions décimales.   | 53   |
| 03     | Technique d'Ensemencement.  | 54   |
| 04     | Technique de Purification et de Conservation.   | 63   |
| 05     | Etapes d'Isolément, Sélection, Purification et Conservation.                                | 64   |
| 06     | Technique de l'antibiogramme.   | 72   |
| 07     | Technique de la mise en évidence de l'activité antibactérienne in vitro sur milieu solide.  | 74   |
| 08     | Technique de la mise en évidence de l'activité antibactérienne in vitro sur milieu liquide. | 75   |

# LISTE DES ABREVIATIONS

## 1- Systemes de solvants pour chromatographie sur couche mince :

A.M. = acétate d'éthyle - méthanol.

B.A.E. = n-butanol - acide acétique - eau.

E.A.E. = éthanol - ammoniacque - eau.

Ep/ Dm= Ether de pétrole /Dichlorométhane.

AE : Acétate d'éthyle.

n-B : n-Butanol.

E : Ethanol.

## 2- Autres abréviations :

M.A. = mycélium aérien.

M.S. = mycélium du substrat.

P.S. = pigments solubles.

G + = Gram positif; G - = Gram négatif.

D.A.P. = acide diaminopimélique.

P.E. = phosphatidyléthanolamine.

P.G. = phospholipides contenant de la glucosamine.

DTA= Dextrose - Tryprtone – Agar.

Rf = rapport frontal.

T. = témoin.

U. V. = ultra-violet.

C.C.M. = chromatographie sur couche mince.

ATCC=American type culture collection.

ISP= International-Streptomyces-Project.

MRSA= Multi Resistant *Staphylococcus aureus*.

IP = Institut Pasteur de Paris.

cw = chemin de wilaya.

mL= mètre linéaire.

μS/cm= micro siemens/ centimètre.

# SOMMAIRE

RESUME, ABSTRACT, صخلم

INTRODUCTION.....01

## PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE

### 1- VALEURS DU SITE D'ETUDE

|   |    |
|---|----|
| 1.1-Introduction.....   | 04 |
| 1.2- Descriptif géomorphologique du lac Oubeira.....            | 04 |
| 1.3- Caractéristiques hydrologiques.....                        | 04 |
| 1.3.1-Rejet vers le bassin de décantation n° 1.....             | 05 |
| 1.3.2-Rejet vers le bassin de décantation n° 2.....             | 05 |
| 1.3.3-Rejet vers le bassin de décantation n°3.....              | 05 |
| 1.3.4-Rejet vers le bassin de décantation n°4.....              | 05 |
| 1.4- Diversité biologique.....                                  | 06 |
| 1.4.1- La faune.....  | 06 |
| 1.4.2 La végétation aquatique émergente.....                    | 06 |
| 1.5- principales fonctions du lac.....                          | 07 |
| 1.5.1- Rétenion des sédiments et des produits toxiques.....     | 07 |
| 1.5.2-L'élimination totale de l'azote organique ou minéral..... | 07 |
| 1.5.3-l'autoépuration naturelle.....                            | 08 |

### 2- DONNEES SUR LES ACTINOMYCETES

|  |    |
|--|----|
| 2.1- L'ordre des Actinomycétales.....  | 09 |
| 2.2- Lieux d'habitats.....   | 09 |
| 2.3- Taxonomie Des Actinomycetes.....  | 10 |
| 2.3.1- Evolution de la taxonomie des actinomycètes.....  | 10 |
| 2.3.2-Critères actuels utilisés pour la classification des Actinomycètes.....                                  | 11 |
| 2.3.2.1- Critères morphologiques .....   | 11 |
| 2.3.2.1.1- Critères macromorphologiques.....   | 11 |
| 2.3.2.1.2 - Critères micro morphologiques.....   | 11 |
| 2.3.2.2- Critères physiologiques.....  | 14 |
| 2.3.2.3- Les caractéristiques chimiques des constituants cellulaires.....                                      | 14 |
| 2.3.2.3.1- Composition pariétale en acides aminés.....   | 14 |
| 2.3.2.3.2- Composition cellulaire en sucres.....   | 14 |
| 2.3.2.3.3- Définition des chimiotypes à partir de la composition cellulaire en acides aminés et en sucres..... | 15 |
| 2.3.2.3.4- Composition en lipides.....   | 15 |
| 2.3.2.3.4.1- Les phospholipides.....   | 15 |

|   |    |
|---|----|
| 2.3.2.3.4.2- Les ménaquinones .....   | 17 |
| 2.3.2.3.4.3- Les acides mycoliques.....   | 17 |
| 2.3.2.4- Les acides nucléiques et la taxonomie des actinomycètes.....           | 17 |
| 2.3.2.5- Clé d'identification.....  | 18 |
| 2.3.3- Les critères d'identification des espèces.....                           | 18 |
| 2.3.3.1- Les caractéristiques culturelles.....                                  | 18 |
| 2.3.3.2- Les caractères physiologiques et la taxonomie numérique.....           | 18 |
| 2.3.3.3- L'hybridation DNA-DNA.....   | 21 |
| 2.4- Les Actinomycète en tant que microorganismes utiles.....                   | 21 |
| 2.4.1- Importance dans le domaine industriel.....                               | 21 |
| 2.4.2 - Importance dans le domaine agronomique.....                             | 21 |
| 2.5- Les Actinomycètes en tant que microorganismes pathogènes et nuisibles..... | 22 |

### **3- LE GENRE *STAPHYLOCOCCUS* :**

|   |    |
|---|----|
| 3.1-Historique.....   | 24 |
| 3.2-Habitat.....  | 24 |
| 3.3-Position taxonomique.....   | 24 |
| 3.4 Transmission.....   | 25 |
| 3.7-Substances élaborées par les staphylocoques.....  | 26 |
| 3.8- Infections dues aux staphylocoques.....  | 26 |
| 3.9- Maladies causées par les Staphylocoques.....   | 28 |
| 3.10-La résistance aux antibiotiques chez <i>S. aureus</i> .....                                | 29 |
| 3.10.1-Histoire d'antibiotiques et de résistance bactériennes à propos de <i>S.aureus</i> ..... | 29 |
| 3.10.2-Nouvelle résistance: VISA / GISA.....  | 30 |

### **4-*Pseudomonas aeruginosa* :**

|  |    |
|--|----|
| 4.1-Historique.....                    | 31 |
| 4.2-Definition.....                    | 31 |
| 4.3- Habitat.....                      | 31 |
| 4.4-Classification .....               | 33 |
| 4.5-Pouvoir pathogène.....             | 33 |
| 4.6- Résistance aux antibiotiques..... | 34 |

### **5- *Escherichia coli*:**

|   |    |
|---|----|
| 5.1- Historique.....                      | 36 |
| 5.2— Habitat.....                         | 36 |
| 5.3- Caractéristiques biochimiques.....   | 36 |
| 5.4- Pouvoir pathogène naturel.....       | 37 |
| 5.4.1- Infections extra-intestinales..... | 37 |
| 5.4.2- Infections intestinales.....       | 37 |
| 5.5- Pouvoir pathogène pour l'animal..... | 38 |

### **6-LES ANTIBIOTIQUES :**

|  |    |
|--|----|
| 6.1- Introduction.....                     | 39 |
| 6.2-Définition.....                        | 39 |
| 6.3- Classification des antibiotiques..... | 39 |

|   |    |
|---|----|
| 6.4-Les mécanismes envisageables pour mener une action antibactérienne .....  | 43 |
| 6.4.1-Perturbation du métabolisme cellulaire (antimétabolites) .....  | 43 |
| 6.4.2-Inhibition de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes.....  | 43 |
| 6.4.3-Interaction avec la membrane plasmique.....   | 43 |
| 6.4.4-Perturbation de la synthèse protéique.....  | 43 |
| 6.4.5-Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN.....   | 43 |
| 6.5-Résistances Bactérienne aux antibiotiques.....  | 45 |
| 6.6-Origine du phénotype de résistance aux antibiotiques chez les bactéries.....  | 45 |
| 6.6.1- Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'une mutation.....  | 45 |
| 6.6.2- Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'un transfert de gène de résistance entres bactéries..... | 46 |
| 6.7-Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries.....  | 46 |
| 6.7.1-Inactivation de l'antibiotique (détoxification enzymatique de l'antibiotique) .....   | 46 |
| 6.7.2-Réduction de la perméabilité de l'antibiotique.....   | 46 |
| 6.7.3-Modification de la cible de l'antibiotique.....   | 46 |
| 6.7.4 – Développement d'une autre voie métabolique.....   | 46 |
| 6.8-Facteurs favorisant l'apparition des phénotypes de résistance chez les bactéries.....   | 47 |
| 6.9-Mode de transfert de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries.....  | 48 |
| 6.10-Le rôle des éléments transposables dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques.....                                | 49 |

## **MATERIEL ET METHODES**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1- Site d'étude.....</b>   | <b>50</b> |
| <b>2- Echantillonnage.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3- Prélèvement.....</b>  | <b>52</b> |
| <b>4-Analyses des échantillons mères.....</b>                                       | <b>52</b> |
| 4-1 Analyses physico-chimiques.....   | 52        |
| 4-1-1- Mesure du pH.....  | 52        |
| 4-1-2- Mesure de la température.....  | 52        |
| 4-1-3- Mesure de la conductivité électrique (CE) norme AFNOR T 91-031.....          | 52        |
| <b>5- Isolement et Purification.....</b>  | <b>53</b> |
| 5-1 Dilution.....   | 53        |
| 5-1-1- Préparation des dilutions décimales.....                                     | 53        |
| 5-2 Ensemencement.....  | 54        |
| 5-2-1 Technique.....  | 54        |
| 5-2-2 Mise en culture.....  | 54        |
| <b>6 -Milieux de culture utilises.....</b>  | <b>55</b> |
| 6-1- Milieux ordinaires.....  | 55        |
| 6-1-1- Gélose nutritive (GN).....   | 55        |
| 6-2-Milieux d'isolement.....  | 56        |
| 6-2-1 -Milieu gélosé à base de tryptone, glucose et d'extrait de viande (TGEA)..... | 56        |
| 6-2-2 -Milieu Sabouraud.....  | 57        |
| 6-2-3 -Milieu Czapek .....  | 57        |
| 6-2-4 - Milieu Czapek double concentration (voir milieu Czapek).....                | 58        |
| 6-3 -Milieux sélectifs.....   | 58        |
| 6-3-1- Milieu ISP2.....   | 58        |
| 6-3-2- Milieu ISP 3.....  | 58        |

|   |           |
|---|-----------|
| 6-3-3- Milieu ISP 4.....  | 59        |
| 6-3-4 - Milieu ISP5: glycerol – asparagines-agar.....   | 59        |
| 6-3-5 Milieu Tryptone - extrait de levure - glucose (TYG).....  | 59        |
| 6-3-6 Milieu OGYA.....  | 59        |
| 6-3-7 Milieu Sabouraud – Chloramphenical.....   | 60        |
| 6-3-8 Milieu Chitine-Agar.....  | 60        |
| 6-3-9 Milieu asparagine – glucose.....  | 60        |
| 6-4- Milieux électifs.....  | 61        |
| 6-4-1- Milieux de croissance.....   | 61        |
| 6-4-1-1 Milieu dextrose-tryptose-agar.....  | 61        |
| 6-4-2- Milieux de sporulation .....   | 61        |
| 6-4-2-1- Milieu de Cross.....   | 61        |
| 6-4-2-2 Milieu de Gausse.....   | 61        |
| 6-4-2-3 Milieu de Lindenbein .....  | 62        |
| <b>7- Incubation et Lecture.....</b>  | <b>62</b> |
| <b>8- Sélection et Purification des colonies suspectes.....</b>   | <b>62</b> |
| 8-1-Sélection des colonies suspectes.....   | 62        |
| 8-2 Observation microscopique.....  | 62        |
| <b>9- Purification et Conservation.....</b>   | <b>63</b> |
| <b>10-Recherche de l'activité antibactérienne.....</b>  | <b>65</b> |
| 10-1 Les souches de références testées.....   | 65        |
| 10-1-1 Origine.....   | 65        |
| 10-1-2 Vérification de la pureté des souches.....   | 65        |
| 10-1-3- Etude des caractères biochimiques des souches cibles.....   | 65        |
| 10-1-3-1 -Etude des caractères biochimiques de la souche de référence cible <i>E.coli</i> Z.....                                    | 66        |
| 10-1-3-2 -Etude des caractères biochimiques des deux souches de <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>1</sub> et X <sub>2</sub> ..... | 67        |
| 10-1-3-3 -Etude des caractères biochimiques de la souches de références cible <i>P.aeruginosa</i> Y.....                            | 68        |
| 10-1-4- Etude de la sensibilité des souches de références cibles aux antibiotiques (Antibiogramme).....                             | 70        |
| <b>11-Production, Purification et Caractérisation Partielle des antibiotiques .....</b>   | <b>74</b> |
| 11-1 Recherche de l'activité antibactérienne in vitro.....  | 74        |
| 11-1-1 sur milieu solide.....   | 74        |
| 11-1-2 Activité in vitro sur milieu liquide.....  | 75        |
| 11-2- Spectre d'activité des souches sélectionnées.....   | 78        |
| 11-3- Production d'antibiotiques en milieu liquide.....   | 78        |
| 11-4- Extraction de l'activité antimicrobienne.....   | 78        |
| 11-4-1- Extraction à partir du filtrat.....   | 78        |
| 11-4-2- Extraction à partir du mycélium.....  | 79        |
| 1-5 Tests d'activité par antibiographie.....  | 79        |
| 11-6 Chromatographie analytique sur couche mince: bioautographie.....   | 79        |
| 11-6-1 Préparation des plaques de gel de silice.....  | 79        |
| 11-6-2 Dépôt des échantillons et développement des plaques.....   | 80        |
| 11-7 Révélation microbiologique (bioautographie par chromatographie sur colonne).....   | 80        |
| 11-7-1Technique de la Chromatographie sur colonne.....  | 81        |

## RESULTATS ET DISCUSSION

|   |    |
|---|----|
| 1- Analyses des échantillons mères..... | 83 |
|---|----|

|   |     |
|---|-----|
| 1-1- mesure du pH.....  | 83  |
| 1-2- Mesure de la température.....  | 83  |
| 1-3- Mesure de la conductivité électrique (CE) .....                                | 84  |
| <b>2-Observation macroscopique des colonies suspectes</b> .....                     | 85  |
| <b>3- Observation microscopique des colonies suspectes</b> .....                    | 88  |
| <b>4-Observation macroscopique des souches de référence</b> .....                   | 95  |
| <b>5- Observation microscopique des souches de référence</b> .....                  | 96  |
| <b>6- Etude des caractères biochimiques des souches de référence cibles</b> .....   | 97  |
| 6.1 - <i>Escherichia coli</i> Z ATCC.....   | 97  |
| 6.2 - <i>Staphylococcus aureus</i> X1 ATCC (MRSA) .....                             | 97  |
| 6.2 - <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>2</sub> ATCC.....                         | 98  |
| 6.3- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Y ATCC.....                                      | 99  |
| <b>7- AntibioGramme des souches de référence cibles</b> .....                       | 99  |
| 7.1- <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>1</sub> ATCC (MRSA) .....                  | 99  |
| 7.2- <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>2</sub> ATCC.....                          | 101 |
| 7.3 - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> Y ATCC.....                                     | 103 |
| 7.4- <i>Escherichia coli</i> Z ATCC Z.....  | 104 |
| <b>8- Test de l'activité antibactérienne in vitro sur milieu solide</b> .....       | 105 |
| <b>9- Test de l'activité antibactérienne in vitro sur milieu liquide</b> .....      | 101 |
| <b>10- La production du métabolite antibactérien en milieu liquide</b> .....        | 107 |
| <b>11- Tests de l'activité antibactérienne à partir des extraits</b> .....          | 110 |
| 11-1 tests de l'activité antibactérienne des extraits a partir du filtrat.....      | 110 |
| 11.2- test de l'activité antibactérienne de l'extrait methanolique du mycélium..... | 110 |
| <b>12- La chromatographie sur couche mince</b> .....                                | 112 |
| <b>CONCLUSION</b> .....   | 115 |

## ANNEXES

|   |     |
|---|-----|
| <b>Annexes 1 : figures</b> .....  | 118 |
| 1- Mode opératoire du système API 20 E.....   | 118 |
| 2- Fiche de résultat du système API 20 E.....   | 119 |
| 3- Mode Opératoire de du Système API Staph.....   | 119 |
| 4- Fiche de résultat du système API Staph.....  | 120 |
| 5- Mode Opératoire du système API 20NE.....   | 120 |
| 6- Fiche de résultat du système API 20N E.....  | 121 |
| <b>Annexes 2 : Tableaux</b> .....   | 122 |
| 1-Tableau 31 : Tableau de lecture du système API 20E.....   | 122 |
| 2-Tableau 32 : Tableau de lecture du Système API Staph.....   | 123 |
| 3-Tableau 33 : Tableau de lecture du Système API 20 NE.....   | 124 |
| <b>Annexes 3 : composition des réactifs</b> .....   | 125 |
| 1- Compositions des réactifs utilisés lors de la lecture du système API 20 E.....                             | 125 |
| 2- composition du milieu API Staph.....   | 125 |
| 3- Propriétés physiques des solvants organiques utilisés .....  | 125 |
| <b>Annexes 4 : Planches</b> .....   | 126 |
| Planches des photos des observations macroscopiques et microscopiques des souches d'actinomyètes isolées..... | 126 |
| <b>REFERENCES BIBLIGRAPHIQUES</b> .....   | 160 |

# RESUME

Notre travail a pour but la mise en évidence de la production de molécules antibactériennes par des souches d'Actinomycètes isolées à partir du lac Oubeira d'El Kala.

A partir de quatre échantillons d'eau du lac, vingt-deux souches d'Actinomycètes ont été isolées et purifiées, en utilisant la technique de dilution et un nombre important de milieux de culture, simples, sélectifs et électifs. La sélection a été basée sur les caractères macromorphologiques et micromorphologique. Ces souches ont fait l'objet d'une étude portant sur leur capacité à produire des molécules antibactériennes et sur leurs antibiotiques.

Après le test d'activité antibactérienne portant sur l'ensemble des souches contre quatre souches de référence ATCC : 2 souches à Gram Positifs : *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub> (MRSA) multirésistante, *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>2</sub> sensible et deux autres à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* Y ATCC sensible, *Escherichia coli* Z ATCC qui présente une simple résistance contre l'ampicilline à large spectre d'action, cinq d'entre elles se sont avérées actives mais avec absence d'activité antibactérienne sur les souches Gram négatif utilisées si ce n'est la souche S23 qui a une faible activité sur la souche *P.aeruginosa* Y ATCC, les autres sont actives sur les deux souches à Gram positif. La souche S10 isolée à partir du centre du lac sur le milieu de culture Czapek simple concentration est la plus performante avec une zone d'inhibition de 24 mm sur la souche de référence *S.aureus* ATCC X<sub>1</sub> (M.R.S.A), agent d'infection nosocomiale distingué par sa multirésistance et sa capacité de provoquer de graves problèmes sur la santé publique.

L'activité de la souche S10 est due à la production d'un métabolite antibactérien de couleur jaune sécrété après 4 jours d'incubation à 28°C sur le milieu ISP2 liquide à un pH entre 5.31 et 7.52, cet antibiotique est extractible par le dichlorométhane, il est très polaire avec un rapport frontal de 0.84. et il est le dernier produit obtenu lors de la purification par chromatographie sur colonne à gel de silice en utilisant le méthanol (éluant très polaire).

Ce travail a permis de valoriser la microflore du lac Oubaira d'El-Kala par la présence des bactéries filamenteuses à Gram positif (Actinomycètes) capables de produire des molécules antibactériennes actives sur un agent d'infection nosocomial (*S.aureus. MRSA*).

**Mots clés :** Lac, Eau Douce, Actinomycètes, Molécules Antibactériennes, *Staphylococcus aureus*.

# ABSTRACT

Our work consisted in making conspicuous and bringing more to light the anti bacterial molecules production, by actinomycetes strains isolated from “OUBEIRA” lake of EL-KALA.

From 4 water samples of the lake, 22 actinomycetes strains have been isolated and purified using dilution technique and a consequent number of different culture media: simple, selective or by election. The election has been based on macro and micro morphological aspects. These strains have been studied according to their production ability of anti bacterial molecules and to their antibiotics.

After a screening on all strains versus 4 ones of original reference ATCC: 2 of positive Gram : *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub> (MRSA) multi-resistant, *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>2</sub> sensitive, 2 other of negative Gram : *Pseudomonas aeruginosa* Y ATCC sensitive and *Escherichia coli* Z ATCC that occurs with a simple resistances against large spectra action ampicilline.

5 of them are active but without any anti-bacteria activity on the negative Gram strains used apart the one S23 which has a weak activity on the strain *Pseudomonas aeruginosa* Y ATCC, the other are active on the two other strains of positive Gram. The strain S10 isolated from the middle of the lake on the culture medium “Czapek” simple concentration is the most performant with an inhibition zone of 24 mm on the strain of reference *S.aureus* ATCC X<sub>1</sub> (M.R.S.A), Nosocomial infection factor (agent) distinguished by its multi-resistance and its ability to provoke public health harm .

The activity of the strain S10 is due to a yellow colored anti-Bacterial metabolite secreted after 4 days of incubation at 28°C on the ISP2 liquid medium with pH between 5.31 and 7.52, this anti-biotic is highly polar and extractable by the dichloromethane, and it is also purified as a final product on gel chromatography.

Our contribution seems to be positive in the way the work done tends to valorise the micro-flora of “OBEIRA LAKE ” of EL-KALA by the presences of filament-positive - Gram bacteria (actinomycetes) able to produce anti-bacterial molecules on nosocomial infection agent (*S.aureus* M.R.S.A) playing thus a double role of positivity : the public health and environment protection .

**-Key words:** lake, Water, Actinomycetes, antibacterial molecules, *Staphylococcus aureus*.

# ملخص

الهدف من هذا العمل هو البحث عن سلالات الأكتينومييسات في بحيرة أوبيرة بالقالة والقادرة على إنتاج مواد مضادة للبكتيريا.

إنطلاقاً من أربع عينات من ماء البحيرة، تم عزل وتنقية 22 سلالة من الأكتينومييسات، باستعمال تقنية التخفيف، وعدد معتبر من أوساط الزرع: بسيطة، مخيرة ومقترعة، عملية اختيار السلالات قامت على معايير ميكرووماكرو مرفولوجية. بعد اختبار نشاط هذه السلالات المضاد للبكتيريا ضد أربعة سلالات مرجعية ATCC : سلالتين موجبة الغرام: *S.aureus X1* متعددة المقاومة للمضادات الحيوية، *S.aureus X2* حساسة للمضادات الحيوية، وسلالتين سالبة الغرام: *P.aeruginosa Y* حساسة، *E.coli Z* ذات مقاومة بسيطة ضد المضاد الحيوي الأمبيسيلين.

من مجموع هذه السلالات خمسة لها القدرة على إنتاج مواد مضادة للبكتيريا فعالة ضد السلالات المرجعية الموجبة الغرام ماعدا واحدة S23 لها نشاط ضعيف ضد السلالة السالبة الغرام *P.aeruginosa Y*.

السلالة S10 المعزولة من وسط البحيرة على وسط الزرع *Czapec* بسيط التركيز هي الأكثر فعالية بمنطقة مضادة يقدر قطرها بـ 24 مم على السلالة *S.aureus X1* المتميزة بمقاومتها المتعددة وقدرتها على خلق مشاكل خطيرة على الصحة العمومية.

نشاط السلالة S10 يتمثل في إفراز مادة مضادة للبكتيريا صفراء اللون بعد أربعة أيام من الحضان عند درجة الحرارة 28°C في الوسط ISP2 السائل و pH بين 5,33-7,52، هذا المضاد الحيوي تم إستخراجه باستعمال الحال العضوي *Dichloromethane*، ونقي من الشوائب كأخر مادة فصلت أثناء الفصل بطريقة التسجيل اللوني عبر العمود.

عملنا هذا أثبت إحتواء بحيرة أوبيرة بالقالة على بكتيريا ليفية موجبة الغرام ( الأكتينومييسات) قادرة على إنتاج مادة مضادة للبكتيريا فعالة ضد عامل إقراح *S.aureus* .MRSA

– الكلمات المفتاحية : بحيرة، المياه العذبة، الأكتينومييسات، المواد المضادة للبكتيريا، *Staphylococcus aureus*.

# INTRODUCTION

Les actinomycètes sont des organismes procaryotes, classés parmi les bactéries. Ils sont inclus dans l'ordre des Actinomycetales défini dans la huitième édition du manuel de BERGEY (1974) comme regroupant : «des bactéries à Gram positif qui tendent à former des filaments ramifiés, universellement répandus. Ils constituent une part importante de la microflore tellurique et se retrouvent dans l'air, le fumier et les composts, le foin et les pailles, les grains de céréales, les résidus fibreux de cannes à sucre et le pollen des plantes. Généralement neutrophiles, ils peuvent cependant être présent dans certains sols très acides, dans les déserts chauds et secs de divers continents, dans les lacs extrêmement alcalins ainsi que dans certains milieux très salés.

Les Actinomycètes sont aussi retrouvés dans les milieux aquatiques : les lacs, les rivières et les ruisseaux, les mers et les océans. Nombre d'entre eux ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique par la production de substances intéressantes telles que les antibiotiques, les vitamines, des substances anti-histaminiques, vasodilatatrices ou immunostimulante et des enzymes utilisées dans les industries Parmi ces substances, les antibiotiques sont ceux qui ont suscité le plus grand intérêt. Environ 65 % des antibiotiques produits par des microorganismes le sont par des actinomycètes dont un nombre appréciable a trouvé une application thérapeutique.

Leur diversité de colonisation, leur adaptation, leurs résistances à certaines conditions hostiles ainsi que leur importance dans le secteur pharmaceutique font que ces bactéries sont l'objet de nombreuses études scientifiques.

Le parc national d'EL KALA situé à l'extrême nord-est de l'Algérie a la particularité d'abriter le complexe des zones humides les plus prestigieuses de la Méditerranée occidentale, il est connu par sa richesse floristiques et faunistiques. Celui-ci renferme plusieurs

écosystèmes lacustres dont le lac Oubeira situé à 3 Kms à l'ouest de la ville, entre les lacs MELLAH et TONGA.

En 1983 pour marquer l'adhésion de l'Algérie en faveur d'une action internationale pour la protection des zones humides, deux sites lacustres du parc (lac obéira, lac tangua) ont été inscrits sur la liste RAMSAR. En 1990 cette aire protégée est sur la liste de L'UNESCO des réserves de la biosphère dans le cadre du programme MAB ; en 1995 elle bénéficie d'un don de la banque mondiale pour la mise en place d'un plan directeur de gestion durable des ressources. Malheureusement le lac Oubeira est l'objet d'agressions extérieures telles les déversements anarchiques des effluents urbains, les lessivages engendrés par la présence de cités urbaines à sa périphérie et aux activités agronomiques (élevage).

En considérant ce potentiel riche en actinomycètes tant du point de vue de la biodiversité générique et spécifique que du point de vue des propriétés antagonistes notamment antimicrobiennes, un axe de recherche a été initié dans le cadre d'un projet de recherche financé par le Ministère de L'Aménagement du Territoire et de L'Environnement (MATE) dans notre laboratoire depuis 2005. Les objectifs de cet axe étaient d'étudier d'une part, la microflore actinomycétale vivant dans des conditions particulières et propres aux zones humides dans l'espoir de découvrir des taxons originaux, et d'autre part, la possibilité d'obtenir à partir de ces souches de nouvelles molécules d'antibiotiques qui pourraient être efficaces dans un environnement hospitalier qui présente un écosystème favorable au développement des microorganismes opportunistes et qui sont présents dans l'environnement (eau, air, surface) avec une faible virulence mais souvent doués d'une multirésistance aux antibiotiques.

La présence de ces microorganismes opportunistes à l'hôpital rend celui-ci également un lieu à risque pour la santé publique. Les bactéries se multiplient à une cadence tellement rapide qu'il y a toujours possibilité d'une mutation qui peut les rendre multi résistantes aux

antibiotiques. Ce qui a poussé les chercheurs à essayer de palier à ce problème en cherchant à trouver d'autres molécules efficaces seules ou en synergie.

C'est pour cette raison que nous nous sommes intéressées à la recherche des molécules antibactériennes produites par les Actinomycètes isolées des eaux du lac Oubeira afin de les tester sur des bactéries pathogènes en milieu hospitalier.

Partie

Bibliographique

## **1- VALEURS DU SITE D'ETUDE**

### **1.1-Introduction :**

Le lac Oubeira présente, avec l'ensemble du complexe lacustre du PNEK, des valeurs écologiques et des richesses naturelles considérables, à l'échelle mondiale, résultats de sa grande fertilité, son énorme biodiversité et les fonctions multiples qu'il offre à la région, non seulement sur les plans scientifiques et touristiques, mais aussi du côté socio-économique [1].

### **1.2- Descriptif géomorphologique du lac Oubeira :**

Le lac Oubeira est un écosystème, appartenant à l'étage bioclimatique sub-humide chaud. C'est un plan d'eau douce, situé à 8° 33' Est de longitude et à 36° 55' Nord de latitude, à distance de 5km à vol d'oiseau de la mer méditerranée; ses altitudes vont de 0 à 25m par rapport au niveau de sa surface [2] [3].

Le bassin versant couvre une superficie de 9800 ha, dont 2200 ha pour la cuvette seule; cette dernière présente une forme presque circulaire, profonde de 1,5 m en moyenne et variant entre 2 et 3 m à la fin de l'hiver. Le fond du lac, de forme plane, est constitué d'un substratum de sable recouvert d'une couche de vase occupant environ 30 Hm<sup>3</sup> et a environ 0,5m d'épaisseur.

Géographiquement, le lac est bordé :

- au nord par des forêts de chêne liège;
- un terrain de parcours le délimite par l'Est;
- l'Oued El-Messida traversant un terrain agricole très actif par le Sud-est ; du côté Ouest, le lac est bordé par un terrain nu;
- au Sud- Ouest on marque les forêts d'aulne et de frêne [1].

### **1.3- Caractéristiques hydrologiques :**

Le régime hydrologique est en forte corrélation avec les conditions climatologiques, incluant les précipitations irrégulières caractéristiques de la zone, qui subit des écoulements naturels d'eau douce de 31 hm<sup>3</sup> (rapport de l'hydraulique, 1996) à 40 hm<sup>3</sup> par an (rapport du PNEK, 1997). La pluviométrie moyenne varie entre 500 et 1000 mm par an.

A la saison de précipitation, le lac est essentiellement alimenté, d'une part des ruissellements provenant des monts et des collines alluviales du versant et d'autre part des effluents de l'Oued El-Kebir sur la partie Sud est ; à partir d'un niveau d'eau supérieur ou égal 4m, l'afflux prend sa direction de l'Oued El-Kebir vers le lac par l'intermédiaire d'une

tranchée de connexion de l'Oued El-Messida. Le volume d'eau atteint 33 hm<sup>3</sup> en fin d'hiver [4] [2].

A cette période le versant de l'Oued El-Kebir s'intègre à celui du lac et couvrent ensemble une superficie de 11500 ha.

Le réseau hydrique comporte également, selon les données collectées du service technique de l'APC et du service hydraulique de la commune d'El Kala, 4 points de rejet d'eaux résiduaires urbaines:

### **1.3.1-Rejet vers le bassin de décantation n°1 :**

Ce premier bassin est situé à 650 mL (mètre linéaire) de la gare routière d'El Kala, sur la route nationale 44 vers El Tarf. Une partie considérable de l'agglomération des crêtes - en extension continue - est liée à un collecteur principal de 550 mL.

Le même collecteur regroupe aussi la cité Fernana avec son extension de la gare routière à 650 mL ; le siège du PNEK vient de rejoindre ses sources d'eaux usées urbaines depuis 2003 [4] [2].

### **1.3.2-Rejet vers le bassin de décantation n°2 :**

Sur la route cw (chemin de wilaya). 109 vers Annaba, sur le coté gauche. Ce bassin est lié à un collecteur principal d'eaux usées du lotissement Djefjel-Torki Sud, à une distance de 150mL et une partie du lotissement Gélas III à 170mL [4] [2].

### **1.3.3-Rejet vers le bassin de décantation n°3 :**

Le troisième bassin se trouve sur la route cw. 109 vers Annaba sur la droite. Le collecteur principal d'eaux usées est de 380 mL provenant des lotissements Gélas I et II [4] [2].

### **1.3.4-Rejet vers le bassin de décantation n°4 :**

Du coté de la commune de Ain El-Assel, le village de Mechta Abdelkader est connecté à un bassin de décantation implanté au rivage du lac à quelques dizaines de mètres de l'écluse de l'Oued El-Messida, que traverse la conduite d'eaux usées déclarée rompue depuis 1997, cette dernière est actuellement à l'origine d'apport permanent d'eaux usées urbaines dans le lac sans épuration primaire préalable.

En période d'assèchement, le niveau d'eau du point de connexion entre le lac et l'Oued El-Messida diminue et par conséquent, le sens de l'écoulement d'eau est inversé vers l'Oued El-Kebir diminuant ainsi le niveau d'eau du lac [4].

Des facteurs géophysiques tels que la percolation et l'évaporation poussent fortement les pertes hydriques.

L'homme contribue à son tour par la surexploitation de l'eau pour les besoins d'irrigation qui constituent, entre autres, un point considérable de fuites.

Le volume d'eau peut diminuer en été jusqu'à 22 hm<sup>3</sup> avec une profondeur d'environ 0,96m [6] [19].

-Des zones éparses, à savoir Demnet-Rihana, Dai-Graâ et une partie de VSA El-Gantara-El-Hamra, présentent des rejets individuels non contrôlés marquant l'absence de conduites.

#### **1.4- Diversité biologique :**

Compte tenu de la collection énorme d'espèces végétales et animales, dont une grande partie renferme les espèces rares rencontrées uniquement au niveau du parc national d'El Kala, des travaux approfondis et des études écologiques intensives ont été focalisés sur l'importance de l'opulence biologique de la région, seule une partie moindre a pu être recensée dans les inventaires de faune et de flore établis par plusieurs chercheurs, à savoir l'équipe du laboratoire de recherche des zones humides de l'université de Annaba. Le PNEK de son côté propose des projets concernant le plan de gestion écologique des zones humides de la région [1].

##### **1.4.1- La faune :**

le lac Oubeira constitue l'habitat d'espèces animales d'immenses valeurs : des colonies variées d'oiseaux migrateurs et hivernaux ne serait-ce que temporairement dans le versant pour bénéficier des ressources alimentaires riches du versant, des poissons d'eau douce, les batraciens ainsi que de nombreux groupes de la faune inférieure.

La faune recensée dans les inventaires reste insuffisante et ne représente qu'une fraction de la véritable richesse biologique du site [2] [3].

##### **1.4.2 La végétation aquatique émergente :**

Le lit de l'Oued El-Messida est caractérisé par une organisation typique de végétation, sa grande superficie est encombrée d'herbiers flottants, d'hydrophytes couvrant le plan d'eau en partie.

Cette végétation constitue une source nutritionnelle et un élément important dans la protection du lac et le maintien de son équilibre biologique.

## **1.5- principales fonctions du lac :**

### **1.5.1- Rétention des sédiments et des produits toxiques :**

Les précipitations, les ruissellements superficiels et le dévasement d'eaux usées résiduelles dans le lac sont entre autres, à l'origine de son alimentation hydrique, charriant toutes sortes de matières dissoutes ou en suspension et dont une partie importante rentre dans le cycle naturel de synthèse et dans la dégradation biologique ou par des réactions chimiques abiotiques [5].

Les roseaux et les scirpes sont des exemples de la végétation aquatique émergente, à laquelle est attribué un rôle primordial de brise-vent, ceci assure une stagnation du lac et permet au flux d'eau chargée en matière en suspension de subir un traitement mécanique par décantation. Les sédiments contribuent à la restitution du substratum formant au fond du lac, un écosystème spécifique pour les formes de vie anaérobie [5].

Ils présentent également un intérêt dans la compensation de la perte des terres par évaporation, tant que dans le maintien de la fertilité et la structure des rivages.

Des traces de fer, de manganèse, du phosphore et du soufre, sont présentes sous le nom de micropolluants, dont le stockage se fait en partie par adsorption aux particules décantées, pour se retrouver dans les sédiments. Leur remobilisation dans l'hydrosystème est réalisée par l'action des microorganismes spécifiques qui puisent les formes oxydées (oxyhydroxydes de fer, de manganèse, carbonate de calcium ou sulfures) assurant leur nutrition [5].

### **1.5.2-L'élimination totale de l'azote organique ou minéral :**

Est sous l'indépendance exclusive de processus microbiologiques très sensibles incluant les bactéries et les mycètes comme étant les seuls agents dénitrifiant dans le monde vivant.

Anderson et al [5] ; ont estimé une rétention par les végétaux de l'ordre de 50 à 70KgN/ha/an contre 400 à 550Kg N/ha/an éliminés par dénitrification microbienne. Le phénomène de dénitrification conduit à la transformation des nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) en azote particulaire ( $\text{N}_2$ ) rejoignant l'atmosphère à l'état gazeux et diminuant ainsi la charge du système aquatique en cet élément [5] [6].

### **1.5.3-l'autoépuration naturelle :**

Les bactéries sont les éléments clefs du cycle biologique normal des eaux douces. Ce sont elles, en effet, qui vont débarrasser le milieu des matières organiques en solution qu'il contient.

En théorie, tous les microorganismes capables de se développer aux dépens de matières organiques polluantes peuvent être auto-épurateurs, cette capacité auto-épuratrice a des limites, elle est efficace dans la mesure où la charge de pollution ne devient pas excessive.

D'un point de vue sanitaire cette auto-épuration est évidemment bénéfique, les germes d'origine fécale disparaissent à 99,5%. Elle doit traduire un phénomène semblable dans le cas des germes pathogènes intestinaux (en particulier *Salmonella* des fièvres typhoïdes).

Ces quelques notions démontrent sans ambiguïté la réalité du pouvoir auto-épurateur. Celui-ci présente sans aucun doute l'un des apports les plus efficaces à la défense du milieu aquatique en même temps qu'à la protection de la Santé Publique [7].

## **2- DONNEES SUR LES ACTINOMYCETES:**

### **2.1- L'ordre des Actinomycétales :**

Les actinomycètes, organismes procaryotes, sont classés parmi les bactéries. Ils sont inclus dans l'Ordre des Actinomycetales défini dans la huitième édition du manuel de BERGEY (1974)[8] 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  $\mu\text{m}$  mais est généralement inférieur à 1  $\mu\text{m}$  ».

Dans la même édition, les bactéries « corynéformes » (*Corynebacterium*, *Cellulomonas*, etc...) qui présentent un pléomorphisme mais ne sont pas filamenteuses, sont mises dans la même section que les actinomycètes et considérées comme apparentées à ce groupe de microorganismes grâce à certains caractères chimiques relevant des constituants cellulaires [8].

### **2.2- Lieux d'habitats :**

Les actinomycètes sont universellement répandus. Ils constituent une part importante de la microflore tellurique (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970) [9]. On les retrouve dans l'air, le fumier et les composts, le foin et les pailles, les grains de céréales, les résidus fibreux de cannes à sucre, le pollen des plantes et bien d'autres substrats (LACEY, 1973 [10]; BREUILLAND et al., 1974 [11]; COUCH et BLAND, 1974 [12]). Généralement neutrophiles, ils peuvent cependant être prédominants dans certains sols très acides (REED RODRIGUES COELHO et DROZDOWICZ, 1978) [13]. Ils sont présents dans les débris végétaux et les litières, les sols glaciaires de l'arctique, les déserts chauds et secs de divers continents, les sols des régions industrielles pollués par du pétrole ou des métaux lourds, dans les lacs extrêmement alcalins et dans certains milieux très salés (LECHEVALIER, 1981)[14]. Les actinomycètes sont aussi retrouvés dans les milieux aquatiques : dans les lacs, les rivières et les ruisseaux, dans les mers et les océans et même dans des sédiments océaniques situés à plus de 4 000 m de profondeur (CROSS, 1981 [15]; GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983 [16]).

Ces données nous donnent donc un aperçu sur la diversité des milieux colonisés par les actinomycètes ainsi, que leur adaptation et leur résistance à certaines conditions très hostiles.

## **2.3- Taxonomie Des Actinomycetes :**

### **2.3.1- Evolution de la taxonomie des actinomycètes :**

Leur pourcentage de “guanine + cytosine” est relativement élevé (supérieur à 55 mol %).

La classification de ce groupe est en remaniement perpétuel depuis près de 50 ans. Au début, les seuls critères employés pour différencier les genres étaient purement d'ordre macro et micromorphologique.

Dans les années 60, la chimiotaxonomie basée sur l'analyse des constituants cellulaires en acides aminés (Becker et al; 1964) [17] et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970a)[18] a permis d'apporter de nombreuses clarifications et fut ainsi déterminante pour différencier plusieurs genres entre eux.

Par la suite, durant les années 70 et ce, jusqu'aux années 90, l'analyse des lipides membranaires fut d'un apport considérable et complémentaire aux précédentes études chimiques. Ainsi, nous pouvons citer l'analyse des acides mycoliques (Mordarska et al., 1972)[19], des phospholipides (Lechevalier et al., 1977 [20] ; Minnikin et al., 1977 [21]) et des ménaquinones (Collins et Jones, 1981)[22]. Les critères chimiques combinés aux critères morphologiques, se sont révélés très efficaces pour distinguer beaucoup de genres entre eux. Actuellement, leur nombre avoisine les 40, sans compter les genres apparentés phylogénétiquement aux actinomycètes mais ne formant pas de véritable mycélium, comme *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter* etc (Holt et al, 1994)[23].

Entre 1971 et 1990, l'application de la taxonomie numérique aux actinomycètes, a permis d'apporter beaucoup de clareté dans la reconnaissance des espèces (Goodfellow, 1971[24]; Athalye et al, 1985[25] ; Goodfellow et al., 1990[26]). Pour cela de nombreux tests physiologiques sont utilisés.

A partir des années 80 et jusqu'à l'heure actuelle, l'application des techniques de la biologie moléculaire (séquençage de l'ARN ribosomique, hybridation DNA-DNA) dans la classification des actinomycètes a permis de tracer toute la phylogénie de ce groupe (Stackebrandt, 1982[27] Stackebrandt et al., 1983[28] ; Stackbrandt et Schleiger, 1984 [29] ; Stackbrandt et Kroppenstedt, 1987[30]) et à différencier clairement les espèces entre elles.

### **2.3.2-Critères actuels utilisés pour la classification des Actinomycètes [31] :**

Ces critères sont de trois types : morphologiques, physiologiques et chimiques.

#### **2.3.2.1- Critères morphologiques [31] :**

##### **2.3.2.1.1- Critères macromorphologiques :**

###### **- La production ou non du mycélium aérien ou du mycélium du substrat**

Plusieurs genres peuvent ne pas produire de mycélium aérien (MA), mais un seul uniquement ne produit pas de mycélium du substrat (MS) : *Sporichthya*.

###### **-La couleur du mycélium aérien**

La couleur exacte du MA est déterminée en utilisant une charte de couleur. Le nombre d'espèces de *Streptomyces* est tellement élevé que celles-ci sont classées, d'après justement la couleur du MA, dans 7 séries différentes « gris, rouge, jaune, blanc, bleu, vert et violet ». Dans chaque série, plusieurs nuances de couleur peuvent exister :

**Exemple :** série des « gris » gris foncé, gris clair, gris jaunâtre, gris rougeâtre,...

###### **-La couleur du mycélium du substrat et des pigments solubles**

Dans le cas des *Streptomyces*, les espèces peuvent produire :

- un MS de couleur caractéristique : couleur vive ou foncée : rouge, orange, jaune vif, vert, bleu, violet, noir... Ces couleurs permettent de caractériser les espèces;
- un MS de couleur non caractéristique : soit non coloré, soit coloré de manière assez claire, beige, jaune orangé clair, jaune brunâtre, brun ou olive pâle. Ces couleurs peuvent varier suivant, les souches d'une même espèce.

Les mêmes remarques que pour le MS sont également valables dans le cas des pigments solubles.

##### **2.3.2.1.2 - Critères micro morphologiques :**

###### **- La production de spores :**

Le MA et/ou le MS peuvent, soit être stériles, soit produire des spores rondes, ovales ou en bâtonnets.

###### **- L'agencement des spores :**

Les spores peuvent être produites isolément, par deux, par quatre ou en de courtes ou de longues chaînes. elles peuvent être sessiles ou produites par des sporophores bien individualisés pouvant être verticillés ou non, ou encore de manière très irrégulière, le long des filaments mycéliens.

**- La morphologie des chaînes de spores :**

Les chaînes de spores peuvent être droites à flexueuses (type « rectus-flexibilis » = RF), en crochets ou en boucles (type « retinaculum-apertum » = RA) ou en spirales (type « spira » = S). Ces dénominations sont particulièrement importantes pour la classification des espèces de *Streptomyces*. Qui peuvent ainsi être placées dans différentes sections. Des morphologies intermédiaires (RFRA, RFS et RAS) sont également souvent rencontrées.

**-L'ornementation de la surface des spores :**

Les spores peuvent avoir une surface lisse (type « smooth » = sm), rugueuse (type « warty » = wa), épineuse (type « spiny » = sp) ou chevelue (type « hairy » = ha).

**- la fragmentation du mycélium du substrat :**

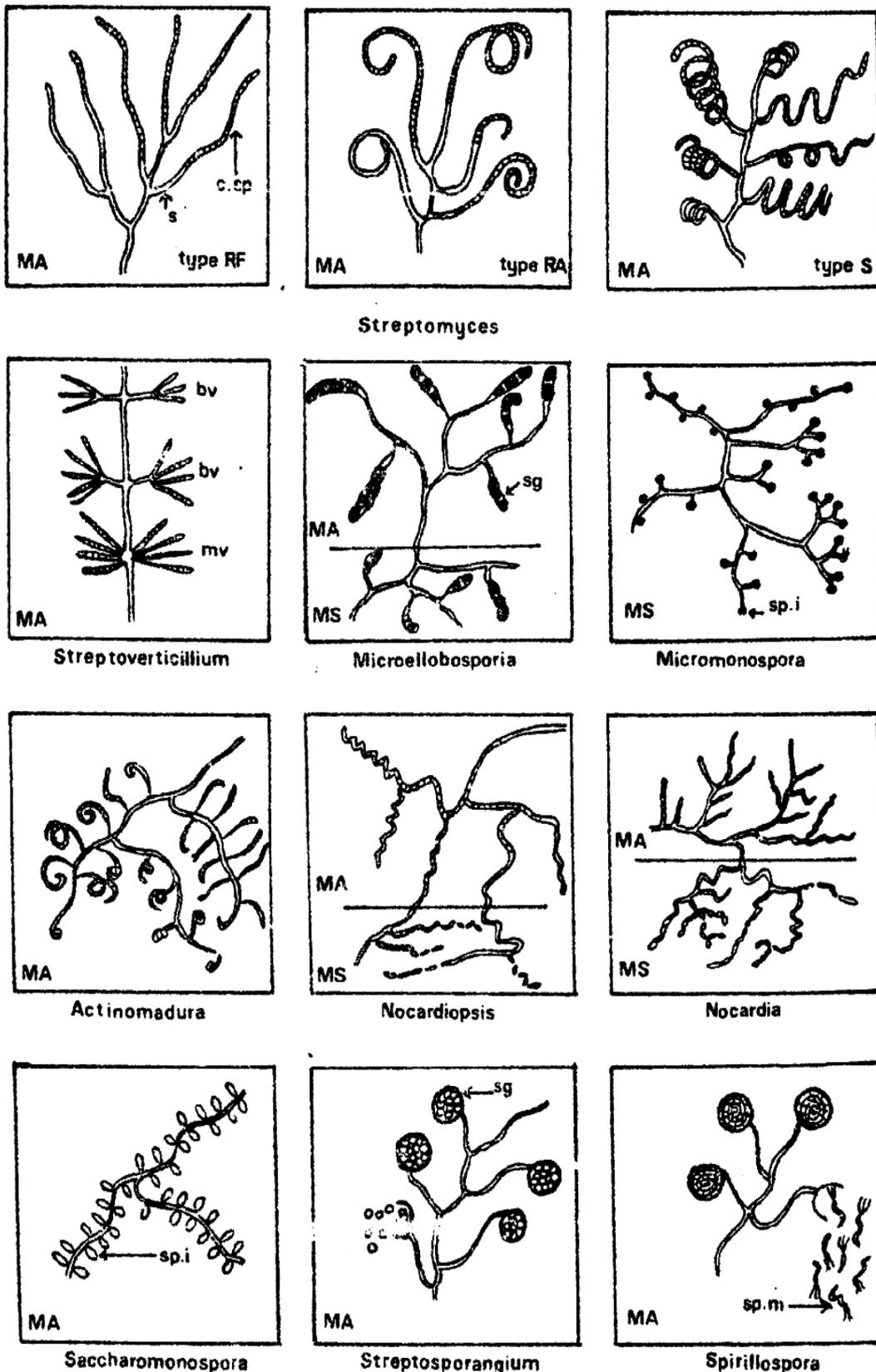
Le MS peut se fragmenter, avec une intensité plus ou moins grande, en éléments coccoïdes et/ou en bâtonnets, non mobiles ou parfois mobiles.

**-La production de structures particulières :**

- La présence ou non de sporanges dans le MA et/ou le MS, la Forme de ces sporanges, le nombre de spores qu'ils contiennent, la mobilité et la forme des sporangiospores.

- La production d'endospores, de sclérotés, de synnemata.

La figure n°1 montre l'aspect micromorphologique des principaux genres d'actinomycètes.



**Figure 1** : micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes

Types : RF = Rectus Flexibilis, RA = Retinaculum Apertum, S = spira, MA = Mycélium Aérien, MS = Mycélium de Substrat, bv = biverticille, mv = monoverticillé, s = sporophore, c.sp = chaîne de spore, sp.i = spores isolées, sp.m = spores mobiles, sg = sporange.

### **2.3.2.2- Critères physiologiques :**

Les critères physiologiques sont très importants pour l'identification des espèces. Ils consistent en des tests de dégradation de nombreuses substances, des glucides, des lipides, des protéines, un des caractères essentiels pour la différenciation des espèces des *Streptomyces* est la production de pigments mélanoïdes. Les critères physiologiques sont primordiaux dans le cas de la taxonomie numérique, laquelle est appliquée pour certains genres par de nombreux auteurs (GOODFELLOW, 1971 [24]; CROSS et GOODFELLOW, 1973[32]; GOODFELLOW et al, 1979[33]; McCARTY et BRODA, 1984[34]; ATHALYE et al. 1985[25]).

### **2.3.2.3- Les caractéristiques chimiques des constituants cellulaires:**

La chimiotaxonomie est un système de classification et d'identification basé sur des caractères chimiques permettant de grouper et de distinguer des microorganismes. L'analyse des acides aminés, des glucides des cellules entières et des lipides membranaires constitue les principaux caractères utilisés en chimiotaxonomie (Jones et Krieg, 1989) [35].

#### **2.3.2.3.1- Composition pariétale en acides aminés :**

Les actinomycètes, comme tous les procaryotes, possèdent une paroi mureïque constituée par de la N-acétylglucosamine, de l'acide muramique, de l'acide glutamique et de l'alanine (L et D). Si la plupart des bactéries non mycéliennes possèdent également de la lysine, la majorité des actinomycètes (surtout ceux formant un véritable mycélium) contiennent plutôt de l'acide diaminopimélique (D.A.P.). Celui-ci peut être sous la forme isomérique LL ou encore DL (=méso) et ce, suivant les genres. Un autre acide aminé, la glycine, est variablement présent. Quelque fois, le D.A.P. est remplacé par de la lysine, de l'ornithine ou de l'acide diaminobutyrique chez les actinomycètes ne formant pas de véritable mycélium (Becker et al., 1965[36] ; Yamagushi, 1965[37]).

#### **2.3.2.3.2- Composition cellulaire en sucres :**

Les actinomycètes possèdent dans leurs cellules divers sucres dont certains ont une importance taxonomique. Ces derniers sont le couple « arabinose-galactose », le couple « arabinose – xylose », le couple « rhamnose-galactose » et enfin le madurose ou 3-0-méthyl-galactose (Lechevalier et Lechevalier, 1970 b[38] ; Labeda et al., 1984[39]).

### **2.3.2.3.3- Définition des chimiotypes à partir de la composition cellulaire en acides aminés et en sucres :**

Les différents chimiotypes rencontrés chez les actinomycètes sont résumés dans le tableau 1.

Les actinomycètes ont été classés dans plusieurs chimiotypes selon leur composition cellulaire en acides aminés (Becker et al., 1965[36] ; Yamagushi, 1965[37]) et en sucres (Lechevalier et Lechevalier, 1970 b[38]). Ainsi, d'après les constituants pariétaux (après hydrolyse forte au HCl 6N) nous distinguons les types I (LL D.A.P. + glycine), II (DL DAP - glycine), III (DL DAP), IV (DL DAP + arabinose + galactose), V (ornithine + lysine), VI (lysine), VII (acide diaminobutyrique, glycine, lysine présente ou absente) et VIII (ornithine).

D'après la composition des cellules entières en sucres (après hydrolyse ménagée avec H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1N), nous distinguons les types A (couple « arabinose-galactose »), D (couple « xylose-arabinose »), E (couple « rhamnose-galactose »), C (pas de couple précédemment cités, surtout l'arabinose, le xylose et le rhamnose) et B (présence de madurose).

Les différents chimiotypes (tableau 1) sont appelés ainsi :

- I C : ex : *Streptomyces, Streptovercillium, Nocardioides...*
- II D : ex : *Actinoplanes, Dactylosporangium, Micromonospora.*
- III B : ex : *Streptosporangium, Planornonospora, Planobispora, Actinomadura...*
- III C : ex : *Nocardiopsis, Thermomonospora, Thermoactinomyces...*
- III E : ex : *Saccharothrix, Kutzneria, Actinosynnema.*
- IV A : ex : *Nocardia, Rhodococcus, Amycolatopsis, Pseudonocardia...*
- V, VI, VII et VIII: divers genres d'actinomycètes non mycéliens.

### **2.3.2.3.4- Composition en lipides :**

Les lipides taxonomiquement importants peuvent être représentés par trois groupes : les lipides polaires ou phospholipides, les ménaquinones et les acides mycoliques.

#### **2.3.2.3.4.1- Les phospholipides :**

La composition des membranes plasmiques en phospholipides est un critère important complétant les chimiotypes définis précédemment. Ainsi, Lechevalier et al. (1977)[20] ont distingué 5 types.

**Tableau 1** : Différents chimiotypes rencontrés chez les Actinomycétales.

| type de paroi | Acide diaminopimélique |              | autres acides aminés |      |      |        | Sucres         |                |                |      |
|---------------|------------------------|--------------|----------------------|------|------|--------|----------------|----------------|----------------|------|
|               | isomère L.L.           | isomère D.L. | Gly.                 | Orn. | Lys. | D.A.B. | couple arb-gal | couple xyl-arb | couple rhm-gal | mad. |
| I C           | +                      | -            | +                    | -    | -    | -      | -              | -              | -              | -    |
| II D          | -                      | +            | +                    | -    | -    | -      | -              | +              | -              | -    |
| III B         | -                      | +            | -                    | -    | -    | -      | -              | -              | -              | +    |
| III C         | -                      | +            | -                    | -    | -    | -      | -              | -              | -              | -    |
| III E         | -                      | +            | -                    | -    | -    | -      | -              | -              | +              | -    |
| IV A          | -                      | +            | -                    | -    | -    | -      | +              | -              | -              | -    |
| V             | -                      | -            | -                    | +    | +    | -      | -              | -              | -              | -    |
| VI            | -                      | -            | -                    | -    | +    | -      | -              | -              | -              | -    |
| VII           | -                      | -            | +                    | -    | +    | +      | -              | -              | -              | -    |
| VIII          | -                      | -            | -                    | +    | -    | -      | -              | -              | -              | -    |

Note : I, II, III,....., VIII : types de paroi définis par Becker et al. (1965)[36], Yamaguchi (1965) [37] et Lechevalier et Lechevalier (1970b) [38] selon le D.A.P. (L.L. ou D.L) et la présence ou non des acides aminés: Gly = glycine; Lys. = lysine; D.A.B. = acide diaminobutyrique et Orn. = ornithine.

A, B, C, D et E : définis par Lechevalier et Lechevalier (1970b)[38] et Stackebrandt et al. (1994)[40] selon la présence des sucres caractéristiques: arb. = arabinose; gal. = galactose; xyl. xylose;

rhm.=rhamnose et mad. = madurose.

- Les types de V à VIII n'ont pas été suivis, dans la littérature, par la lettre « C » bien qu'ils ne disposent pas de sucres taxonomiquement importants.

- Type PI : caractérisé par l'absence de phospholipides azotés tels que la phosphatidyléthanolamine (PE) et la phosphatidylcholine (PC), exemple : *Actinomodura*, *Spirillospora*, *Nocardioides*...

- type PII contenant de la PE. Exemple : *Streptomyces*, *Nocardia*, *Amycolatopsis*, *Spirillospora*, *Kutzneria*...

- type PIII : caractérisé par la présence de PC. Exemple : *Nocardioopsis*, *Pseudonocardia*, *Saccharopolyspora*..

- type PIV présence de phospholipides (plusieurs) à structure non encore déterminée mais contenant de la glycosamine (PG), ainsi que de la P.E Exemple : *Streptosporangium*, *Planomonospora*, *Planobispora*, *Microtetraspora*...

- type PV: contenant les PG et du phosphatidylglycérol. Exemple : *Oerskovia*, *Promicromonospora* et *Cellulomonas*.

#### **2.3.2.3.4.2- Les ménaquinones [41] :**

Les ménaquinones sont des lipides ayant dans leur structure un noyau quinone méthylé et une chaîne carbonée aliphatique composée d'unités isoprènes. Ils sont classés suivant le nombre de ces unités et le degré d'hydrogénation (saturation) de la chaîne (Collins et al., 1980)[41] .

Ex : ménaquinone MK9 (H<sub>2</sub>) présent chez le genre *Planomonospora* : ménaquinone avec neuf unités isoprènes dont deux hydrogénées.

Les ménaquinones ont apporté un complément intéressant en permettant de confirmer les résultats obtenus sur les phospholipides.

#### **2.3.2.3.4.3- Les acides mycoliques [31] :**

Ce sont des lipides complexes et insaturés. Ils sont importants uniquement pour différencier les actinomycètes ayant le chimiotype IV A. Parmi ces derniers, les genres *Nocardia*, *Rhodococcus* possèdent des acides mycoliques tandis que *Amycolatopsis*, *Pseudonocardia* n'en contiennent pas. Les acides mycoliques sont absents chez les actinomycètes ayant un autre chimiotype que le IV A.

#### **2.3.2.4- Les acides nucléiques et la taxonomie des actinomycètes :**

Parmi les caractères importants non seulement dans la reconnaissance des genres mais aussi des familles d'actinomycètes (qui commencent actuellement à être définis), nous noterons la détermination du coefficient de Chargaff (G+C) et le séquençage de l'ADN ribosomique, lesquels ont permis en outre de tracer toute la phylogénie des actinomycètes.

La détermination du coefficient de Chargaff a permis de reconsidérer la définition des actinomycètes dont l'ADN contient un pourcentage de G+C supérieur à 55% mol. Ceci a permis de différencier la lignée des actinomycètes de celle des Bacillaceae, des Lactobacillaceae et d'autres bactéries à Gram positif. De même, d'autres bactéries non mycéliennes telles que *Corynebacterium*, *Cellulomonas*, *Arthrobacter* et même *Micrococcus*, sont considérées comme faisant partie de la lignée phylogénétique des actinomycètes (Stackebrandt et al., 1981[42] ; Goodfellow, 1985 [43]).

Le séquençage de l'ADN ribosomique permet de différencier nettement les genres entre eux, mais la méthode, trop « lourde » et complexe, est moins utilisée que la chimiotaxonomie, plus abordable (Goodfellow, 1985[43]).

### **2.3.2.5- Clé d'identification :**

Les critères chimiques et morphologiques permettent ainsi de déterminer les différents genres appartenant à l'ordre des Actinomycetales, comme nous le constatons dans la figure 2.

### **2.3.3- Les critères d'identification des espèces :**

#### **2.3.3.1- Les caractéristiques culturelles :**

Auparavant, les espèces étaient principalement différenciées entre elles par la couleur des mycélia aériens et du substrat, et celle des pigments solubles, ce qui permet la description d'un nombre trop important d'espèces et engendre une grande confusion, particulièrement chez le genre *Streptomyces* où pas moins de 463 espèces furent répertoriées en 1974 (Nonomura, 1974[44]; Pridham et Tresner, 1974[45]). Actuellement, même si l'on tient toujours compte de la couleur des mycélia, ce facteur ne constitue plus un caractère majeur pour la distinction entre deux espèces données.

#### **2.3.3.2- Les caractères physiologiques et la taxonomie numérique :**

En plus des caractères morphologiques et chimiques, l'identification des espèces est surtout basée sur les caractères physiologiques. Ces derniers concernent l'utilisation ou non de différentes substances glucidiques, lipidiques et protidiques, la résistance aux agents antimicrobiens et à divers agents physico-chimiques (pH, température, salinité).

L'ensemble des caractéristiques physiologiques peut servir à définir des pourcentages de similarité entre les organismes grâce à l'utilisation de coefficients de Jaccard, Sokal et Michener). C'est la taxonomie numérique (Goodfellow, 1985[43]). Goodfellow (1971)[24] fut l'un des premiers chercheurs à avoir appliqué cette analyse aux actinomycètes, laquelle consiste à utiliser un grand nombre de caractères physiologiques, considérés comme ayant une importance égale, et ce, pour rassembler ou au contraire séparer les souches de microorganismes entre elles. L'application de cette analyse n'est rendue possible qu'avec l'utilisation des microordinateurs, à cause de la lourde charge des calculs.

Les résultats les plus spectaculaires ont été obtenus sur le genre *Streptomyces*. En effet, nombre d'espèces de ce genre, qui a été de 463 (Pridham et Tresner, 1974) [45] a été réduit à 142 (Williams et al., 1989)[46]. De même, les genres *Actinopicnidium*, *Actinosporangium*, *Chaina*, *Microellobosporia* et *Elytrosporangium* ont été regroupés dans le genre principal,

*Streptomyces* (Williams et al., 1983[47]). Le genre *Rhodococcus* a été créé grâce à cette analyse (Goodfellow Alderson, 1977) [48].

La taxonomie numérique a apporté énormément de clarté dans la reconnaissance auparavant très confuse, des espèces. Le plus intéressant est que les différents chercheurs ont noté une excellente corrélation entre les résultats obtenus lors de la taxonomie numérique et ceux relatifs à la chimiotaxonomie et aux analyses des acides nucléiques (entre autres, l'hybridatic DNA-DNA) (Labeda, 1988[49] ; Goodfellow et al., 1990 [26] ,[31]).

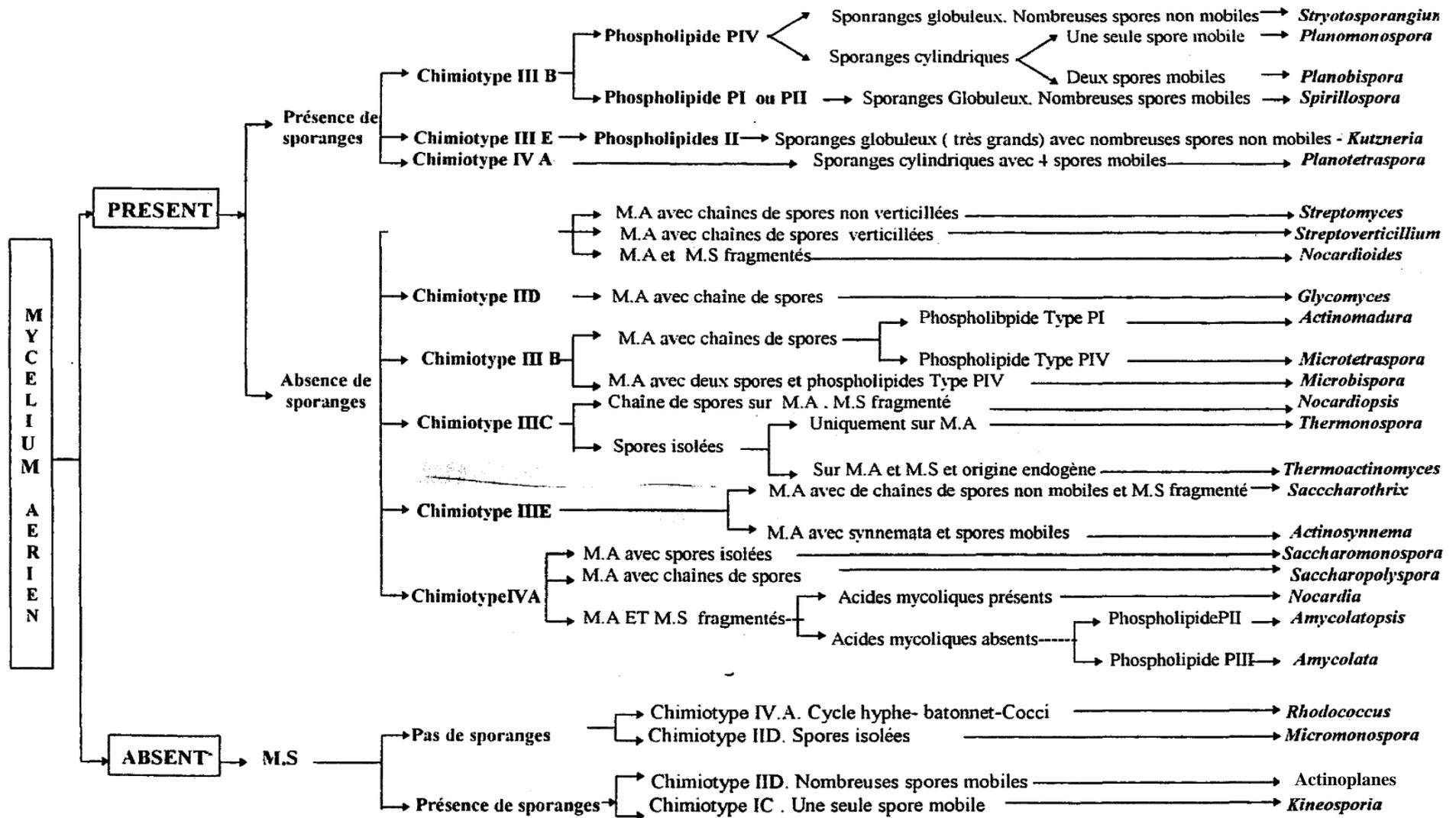


Figure 2 : Clé d'identification des principaux genres d'actinomycètes  
 M.A : mycelium aérien , M.S : mycelium du substrat [31]

### **2.3.3.3- L'hybridation DNA-DNA :**

L'hybridation DNA-DNA permet de déterminer les similitudes génotypiques des souches. Au delà de 70% de similitude, deux souches sont considérées comme appartenant à une même espèce. L'hybridation DNA-DNA s'avère indispensable lorsque les caractères phénotypiques ne suffisent pas à l'identification [31].

## **2.4- Les Actinomycète en tant que microorganismes utiles :**

### **2.4.1- Importance dans le domaine industriel :**

Les actinomycètes ont un rôle très important dans le secteur pharmaceutique. De nombreux isolats produisent des substances intéressantes, telles que les antibiotiques les vitamines, des substances anti-histaminiques, vasodilatatrices ou immunostimulante et des enzymes utilisées dans les industries; certaines souches interviennent même dans la transformation des stéroïdes en dérivés plus intéressants (DOMMERGUES et MANGENOT, 1970 [9] ; ASSELINEAU et ZALTA, 1973 [50] ; WAGMAN et WEINSTEIN, 1980 [51] ; STANIER et al., 1982 [52] ; TYRABI et ESTIENNE, 1983 [53]).

Parmi ces substances, les antibiotiques sont ceux qui ont suscité le plus grand intérêt. TIRAPY et ESTIENNE (1983)[53], rapportant les valeurs établies à partir des données du « Hand Book of Antibiotic Compounds, 1980 », signalent qu'environ 65 % des antibiotiques produits par des microorganismes, le sont par des actinomycètes. Un nombre appréciable d'antibiotiques antibactériens, antifongiques et anticancéreux, a trouvé une application dans la thérapeutique. Le plus grand nombre d'antibiotiques est produit par le genre *Streptomyces* (Streptomycine, Tétracycline, Kanamycine); 50 à 70 % des souches telluriques de *Streptomyces*. Sont capables de sécréter des antibiotiques (TYRABI et ESTIENNE, 1983) [53].

### **2.4.2 - Importance dans le domaine agronomique :**

Les actinomycètes constituent l'un des plus grands groupes de la population microbienne du sol; on a suggéré plusieurs explications à cette large distribution, telles que

leur grande capacité d'utilisation des substrats et leur activité antagoniste vis-à-vis des microorganismes de même habitat.

(KUSTER, 1976[54] ; ISHIZAWA et ARARAGI, 1976 [55]; ALEXANDER, 1977[56]).

DOMMARGUES et MANCENOT (1970) [9] rapportent que les actinomycètes sont aptes à dégrader les substances organiques non biodégradables par les champignons et les bactéries. Ces microorganismes contribuent énormément à la dégradation et au recyclage de polymères complexes tels que les polysaccharides et même les lignocelluloses des plantes (LECHEVALIER 1981 [14] ; GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983[16]); ils jouent, par conséquent, un rôle dans la fertilité des sols.

Les actinomycètes du genre *Frankia* sont des fixateurs symbiotiques de l'azote atmosphérique, formant des nodules chez de nombreuses plantes dicotylédones arbustives, autres que les légumineuses (BEICKING, 1974[57]). Ces plantes peuvent être trouvées dans toutes les parties du monde, y compris les régions tropicales et arctiques; elles sont des « pionniers » extrêmement importants dans les régions où les conditions nutritionnelles limitent la croissance des autres espèces végétales (LECHEVALIER, 1981[14]).

Grâce à leurs propriétés antagonistes, les actinomycètes sont également utilisés pour le contrôle biologique des maladies de certaines plantes; GOODFELLOW et WILLIAMS (1983) [16] ont signalé quelques succès dans la réduction de maladies fongiques.

## **2.5- Les Actinomycètes en tant que microorganismes pathogènes et nuisibles :**

Les actinomycètes peuvent être phytopathogènes. *Nocardia vaccini*, *Rhodococcus fasciens* et quelques espèces de *Streptomyces* dont *S.scabies*, infectent plusieurs plantes. Dont la pomme de terre (GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983) [16].

Plus nombreux sont les genres et espèces d'actinomycètes pathogènes pour l'homme et les animaux. Certains sont connus depuis très longtemps, comme les agents de la tuberculose et la lèpre (*Mycobacterium*). Des espèces comme *Nocardia asteroides*, *Actinomyces israelii*, *Dermatophilus congolensis*, *Streptomyces somaliensis*, sont également responsables de diverses infections telles que les antimycoses, les nocardioses pulmonaires et systémiques.,

les Actinomycétomes. D'autres genres et espèces peuvent être des pathogènes opportunistes (MISHRA et al., 1980[58]; LECHEVALIER 1981[14]).

Certains sont responsables de sérieuses réactions d'hypersensibilité et d'allergies pulmonaires (LACEY, 1981) [59].

En fin, les actinomycètes peuvent également être responsables du goût et de l'odeur désagréable (moisi) de l'eau des réservoirs et même de l'eau potable (LECHEVALIER, 1981[14] ; GOODFELLOW et WILLIAMS, 1983 [16]).

### **3- LE GENRE *STAPHYLOCOCCUS* :**

#### **3.1-Historique :**

Les *staphylocoques* ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de «*Staphylocoque*» pour décrire ces grains (kokkos) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (staphylos). En 1884, Rosenbach a obtenu des cultures pures de ces bactéries. Il a scindé le genre *Staphylococcus* en deux groupes selon que les colonies étaient blanches ou dorées [60].

#### **3.2-Habitat:**

Il s'agit de germes très répandus dans la nature (air, eau, sol). Les staphylocoques, en particulier les espèces *S. aureus* et *S. epidermidis*, font partie de la flore normale de nombreux individus qui sont des «porteurs asymptomatiques ». Cependant ces souches peuvent être à l'origine d'auto- infections ou contaminer d'autres individus.

On peut estimer que 20 à 75% des sujets sont porteurs de *S.aureus*: porteurs persistants, porteurs occasionnels, ou transitoires à l'opposé, certains individus sont « non porteurs» [60].

L'homme héberge plusieurs espèces de staphylocoques:

- *Staphylococcus aureus* est retrouvé chez 20 à 30% des individus au niveau des fosses nasales et/ou de la gorge, il est également présent en faible quantité dans le tube digestif. A partir du rhinopharynx, la bactérie est disséminée sur la peau (en particulier les mains et le visage) et dans le milieu extérieur;
- *Staphylococcus epidermidis* est présent sur la peau de 85 à 100% des Individus;
- *Staphylococcus capitis* est présent au niveau du cuir chevelu;
- *Staphylococcus auricularis* est isolé autour et dans le conduit auditif externe.

Les animaux hébergent des espèces de staphylocoques qui ne sont pas classiquement retrouvées chez l'homme : *S. hyricus* chez les porcs, les bovins, la volaille ; *S. intermedius* chez les chiens et les chevaux [61].

#### **3.3-Position taxonomique:**

La famille des Micrococcaceae est composée de trois genres de cocci à Gram positif en amas qui diffèrent par leur G+C%: *Staphylococcus* (30-39%), *Micrococcus* (65-75%) et *Planococcus* (48-52%). Les espèces appartenant à ces trois genres possèdent une catalase et se développent en aérobiose [61].

### 3.4 Transmission [60]:

Les différentes voies de transmission des Staphylocoques sont représentées dans la figure 3.

Les Staphylocoques contaminent largement les surfaces, l'air, l'eau, et l'homme en est le principale réservoir; malades porteurs de lésions ouvertes, soit et surtout porteurs sains qui hébergent la bactérie au niveau des fosses nasales, de l'intestin, de la peau et de ses annexes glandulaire.

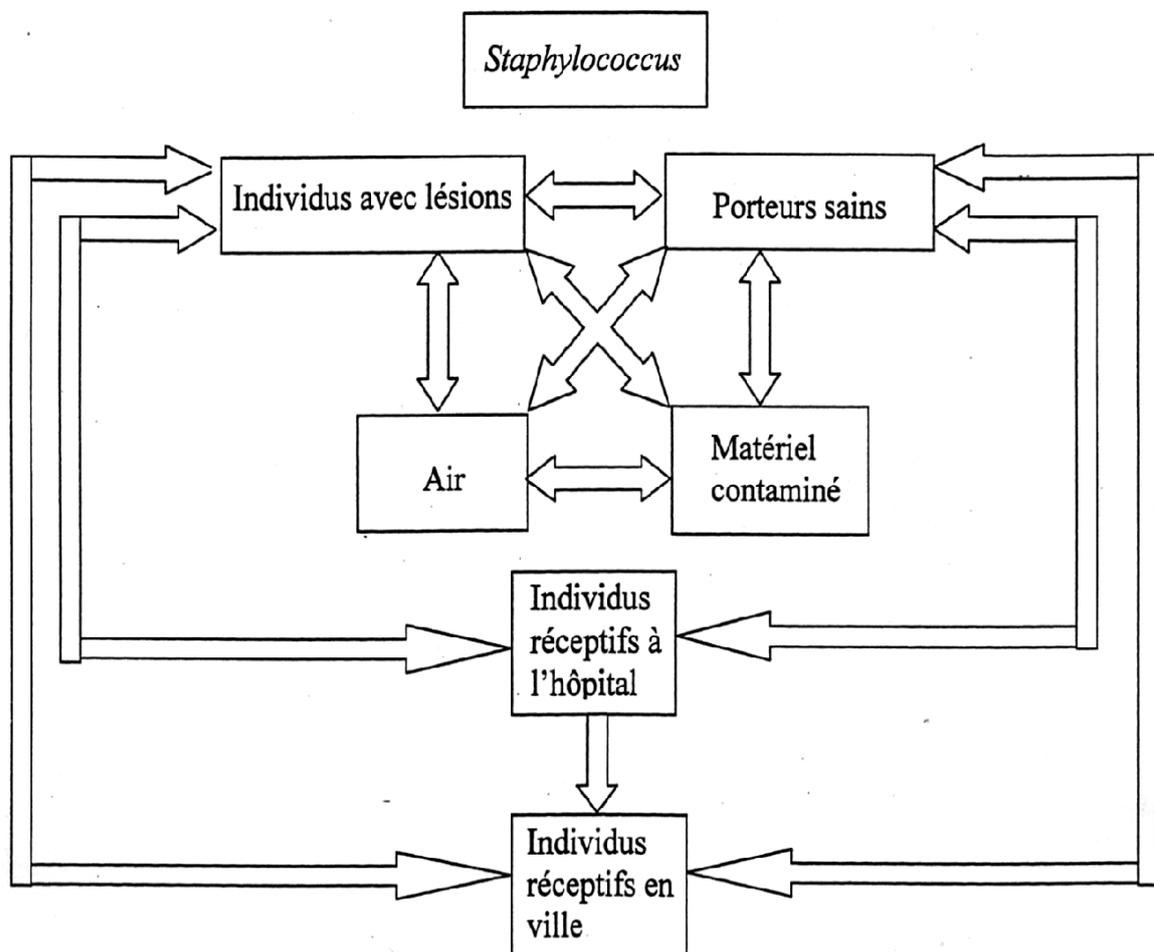


Figure 3 : Les différentes voies de transmission des staphylocoques. [60]

### 3.7-Substances élaborées par les staphylocoques [62]:

Les staphylocoques produisent plusieurs substances qui sont de deux types; toxines et les enzymes, et qui sont mentionnées dans le tableau 2 :

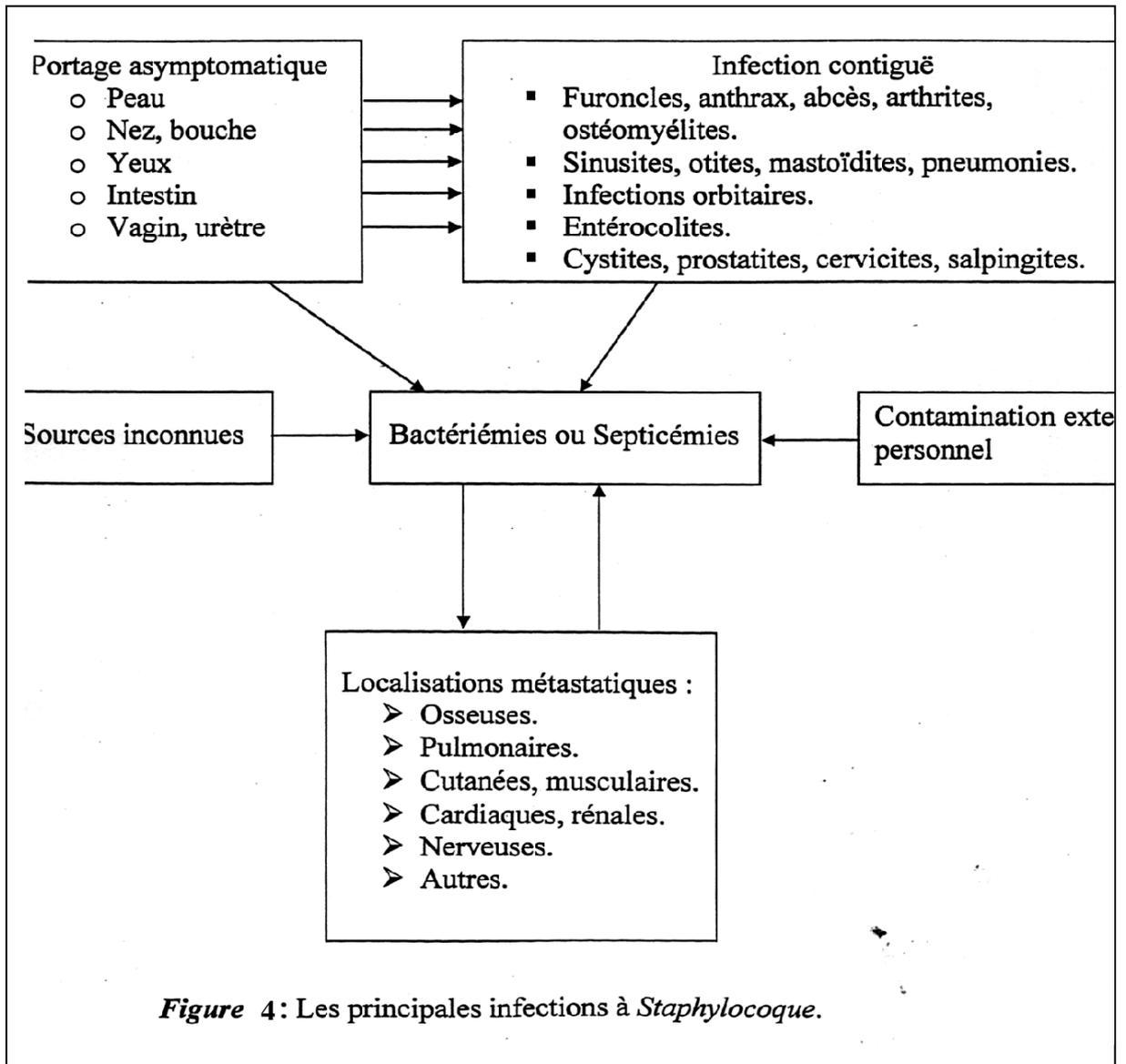
**Tableau 2** : Toxines et enzymes produites par les Staphylocoques.

| Produits                  | Actions physiologiques  |
|---------------------------|---|
| - Catalase                | Transforme l'eau oxygénée en eau et oxygène.  |
| - <b>Coagulase</b>        | Réagit avec la prothrombine pour former un complexe qui peut cliver le fibrinogène et former un caillot de fibrine.   |
| - <b>DNase</b>            | Hydrolyse l'ADN.  |
| - Entérotoxine            | Divisée en toxines thermorésistantes de 6 types connus (A, B, C1, C2, D, E). responsable des troubles gastro-intestinaux typiques d'intoxication alimentaire. |
| - Exfoliatine             | Toxine causant la perte des couches superficielles de la peau dans un syndrome ; appelé : la peau ébouillantée.   |
| - Hyaluronidase           | Hydrolyse l'acide hyaluronique du tissu conjonctif permettant la pénétration et la propagation des bactéries.   |
| - B-Lactamase             | Dégrade la pénicilline.   |
| - Lipases                 | Hydrolysent les lipides en acides gras et glycérol.   |
| - Protéine A              | Est antiphagocytaire par compétition avec les neutrophiles pour fragment Fc des IgG.  |
| -Protéinases              | Hydrolysent les protéines.  |
| -Toxines-1 du syndrome de | Toxines staphylococciques associées à la fièvre, au choc, et à l'implication des systèmes multiples du choc toxique.  |

### 3.8- Infections dues aux staphylocoques [60] :

Les infections Staphylococciques conduisent à la formation d'abcès, de férocles , ou bien de l'anthrax, de la cellulite, ainsi que des réactions inflammatoires aiguës.

Il existe plusieurs infections qui sont dues aux staphylocoques et qui sont indiquées dans la figure 4 ci-dessous, ainsi que leurs localisations.



### 3.9- Maladies causées par les Staphylocoques [63] :

Les Staphylocoques sont la cause de plusieurs maladies illustrées dans le tableau 3.

**Tableau 3** : Maladies causées par les Staphylocoques.

| Type d'infection                         | Symptômes  |
|--|--|
| Infections de la peau et des tissus mous | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Furoncles, abcès.</li> <li>➤ Infection des plaies.</li> <li>➤ Cellulite.</li> </ul>                     |
| Bactériémie (souvent avec des abcès)     | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Endocardites.</li> </ul>  |
| Infections du système nerveux central    | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Abcès du cerveau.</li> <li>➤ Méningite rare.</li> <li>➤ Abcès épidual.</li> </ul>                       |
| Infections pulmonaires                   | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Embolie.</li> <li>➤ Aspiration.</li> </ul>  |
| Muscles et squelette                     | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Ostéomyélite.</li> <li>➤ Arthrite.</li> </ul>   |
| Tractus génito-urinaire                  | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Abcès rénal.</li> <li>➤ Infection du tractus urinaire inférieur.</li> </ul>                             |
| Maladies provoquées par des toxines      | <ul style="list-style-type: none"> <li>➤ Syndrome du choc toxique.</li> <li>➤ Syndrome de lyell.</li> <li>➤ Intoxication alimentaire.</li> </ul> |

### 3.10-La résistance aux antibiotiques chez *S. aureus* [62]:

#### 3.10.1-Histoire d'antibiotiques et de résistance bactériennes à propos de *S.aureus* :

Le tableau 4 résume la chronologie d'événements importants de l'histoire de la résistance de *S.aureus* aux principaux agents antimicrobiens.

**Tableau 4** : Histoires d'antibiotiques et de résistances bactériennes à propos de *S. aureus*

|             |  |
|-------------|--|
| 1942        | Découverte de la pénicilline<br>Premières souches de <i>S. aureus</i> résistants à la pénicilline  |
| années 50   | Augmentation de la proportion des souches de <i>S.aureus</i> résistants à la pénicilline   |
| 1956        | Découverte de la vancomycine   |
| 1958        | La vancomycine est approuvée par la FDA (Food and Drug Administration) et introduite en clinique   |
| > années 60 | Introduction des pénicillines anti-staphylococciques (famille de la méticilline)<br>Emergence de souches de <i>S. aureus</i> résistantes à la méticilline (methicillin-resistant <i>S. aureus</i> , MRSA).<br>La vancomycine est réservée aux cas d'allergie aux beta-lactamines |
| années 70   | Augmentation de la proportion des souches de MRSA<br>Augmentation de l'utilisation de vancomycine  |
| 1977        | Traitement de la colite à <i>Clostridium difficile</i> par vancomycine par voie orale  |
| années 80   | MRSA endémiques dans la plupart des hôpitaux, en particulier aux USA<br>Utilisation élargie de vancomycine, y compris en prophylaxie chirurgicale dans les hôpitaux à forte endémicité pour MRSA<br>Introduction et utilisation large de la teicoplanine                         |
| 1986        | La vancomycine hautement purifiée est disponible, rendant son utilisation plus aisée et mieux supportée  |
| 1987        | Documentation des premiers cas d'infections à staphylocoques à coagulase négative résistants aux glycopeptides   |
| 1988        | Emergence des entérocoques résistants aux glycopeptides  |

Jusqu'ici, cette capacité de résistance n'était pas associée à un épuisement total des ressources thérapeutiques, les glycopeptides (vancomycine et teicoplanine) demeurant encore uniformément efficaces contre MRSA, multirésistants ou non.

### **3.10.2-Nouvelle résistance: VISA / GISA:**

Les souches de *S. aureus* responsables d'infections n'ayant pas répondu au traitement de Vancomycine en 1996 au Japon, ainsi qu'en 1997 aux Etats-Unis, ou en France, montrent une sensibilité diminuée à cet antibiotique. Depuis, plusieurs cas semblables ont été documentés aux seins d'hôpitaux des quatre continents au moins.

#### **4-*Pseudomonas aeruginosa* :**

##### **4.1-Historique:**

Bacille pyocyanique du grec Puon=Pus et Kuanos=Bleu foncé est désigné sous le nom d'espèce *Pseudomonas aeruginosa* ; il a été isolé en 1882 par Gessard [60].

##### **4.2-Definition:** [64] [65]

- bacille fin, Gram négatif, rarement immobile, non sporulé.
- bactérie chimio-organotrophe avec un métabolisme strictement respiratoire, elle est caractérisée par la pluralité des substrats hydrocarbonés utilisés comme source de carbone et d'énergie.
- Contenue en G+C (mole %) compris entre 58-70 %.

##### **4.3- Habitat :** [61] [62]

Ces bactéries largement répandues dans l'environnement vivent en saprophytes dans le sol et l'eau. Elles se retrouvent sur les plantes et les denrées alimentaires entraînant parfois leur altération. Elles peuvent se rencontrer chez l'homme et l'animal au niveau des flores commensales. Certaines jouent un rôle pathogène chez l'homme, animaux et plantes.

La figure 5 montre la localisation du genre *Pseudomonas* au niveau de la microflore normale de l'être humain.

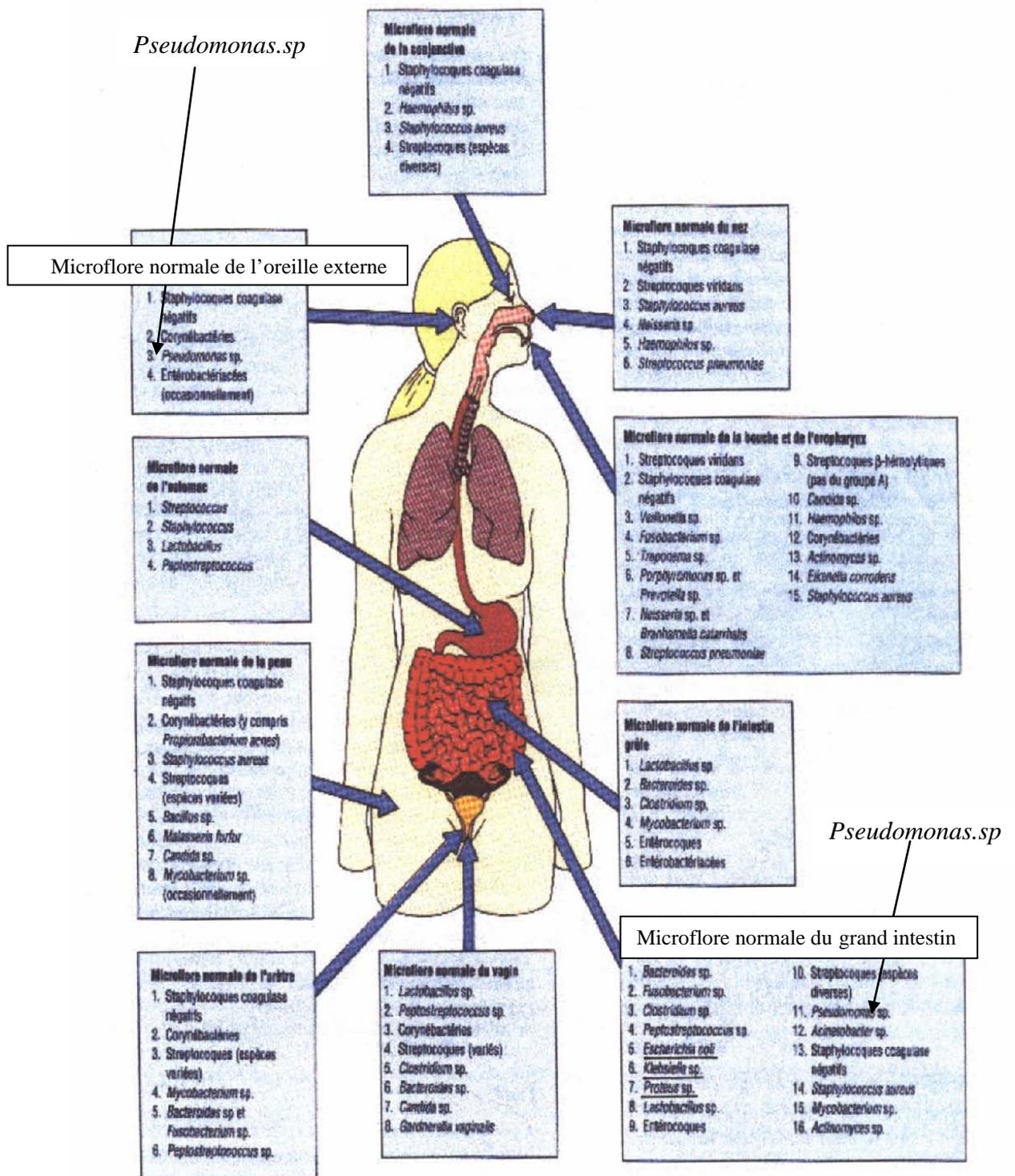


Figure 5 : localisation du genre *Pseudomonas* au niveau de la microflore normale de l'être humain [62].

**4.4-Classification :** [66] [7]

Famille : Pseudomonadaceae

Genre : *Pseudomonas*Espèce : *aeruginosa***4.5-Pouvoir pathogene :** [60] [67]

Le bacille pyocyanique est un agent infectieux redoutable lorsque les défenses immunitaires du sujet sont altérées. Par contre il est peu virulent pour l'individu normal.

Ces infections atteignent les malades sous traitement immunosuppresseur. Les plaies, les voies urinaires et les voies respiratoires sont des portes d'entrées fréquentes.

Les infections causées par l'espece *Pseudomonas aeruginosa* sont représentées dans le tableau 5.

**Exemple :** Chez les brûlés, cette infection est l'une des causes majeures de la mortalité.

**Tableau 5 :** les infections causées par *Pseudomonas aeruginosa* [68]

| Infections                           | Pouvoir pathogène  |
|--------------------------------------|--|
| <p><b>Infections pulmonaires</b></p> | <p>Elles peuvent être primitives ou secondaires à une septicémie.</p> <p>Les pneumopathies primitives s'observent exceptionnellement chez le sujet sain mais sont le lot courant des malades trachéotomisés, des insuffisants respiratoires sous antibiothérapies prolongée, des malades atteints d'hémopathies ou de cancers et recevant une chimiothérapies. le diagnostic est porté sur la présence de plus de <math>10^5</math> CFU/ml dans le LBA ou dans l'aspiration.</p> |
| <p><b>Infections urinaires</b></p>   | <p>Très fréquentes, elles ne sont jamais primitives, mais toujours nosocomiales ou iatrogènes secondaires à une exploitation des voies urinaires</p> <p>Toutes les circonstances entraînant une stase urinaire sont favorisante (obstacle vessie neurologique) ainsi qu'une antibiothérapie préalable mal conduite.</p> <p>Chez la femme, une infection communautaire peut survenir à partir du vagin colonisé.</p>  |

Suite du tableau 5 :

| Exemple d'antibiotique                          | Mécanisme d'action   | Type de résistance |
|---|--|--------------------|
| <b>Infections</b>                               | <b>Pouvoir pathogène</b>   |                    |
| <b>Infections oculaires</b>                     | <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> peut être présent à l'état de saprophyte dans les culs-de-sac conjonctivaux. La colonisation peut être plus importante chez les porteurs de lentilles de contact, les collyre ou les solutions pour lentille de contact ou même l'eau du robinet malencontreusement utilisée pour les nettoyer, sont les vecteurs amenant le bacille pyocyanique au niveau de l'œil. Il peut entraîner des infections superficielles : par exemple, des blépharo-conjonctivites ont été observées au cours de chimiothérapies anticancéreuses chez des malades porteurs de lentilles cornéennes après utilisation de mascara contaminé.</p> |                    |
| <b>Infection ORL (Ortho-rhino-laryngologie)</b> | <p><i>Pseudomonas aeruginosa</i> n'est pas un saprophyte courant du conduit auditif externe : seul 1% des individus sains en est porteur. Il est par contre isolé chez 45% à 65% des sujets ayant une otite externe banale. Celle-ci s'observe en particulier chez les nageurs en raison de la prédilection de la bactérie pour les milieux humides ; mais également en zone tropicale ou après un traumatisme.</p> <p>L'otite maligne externe à bacille pyocyanique a pu être observée chez les diabétiques âgés, les nouveau-nés et les sidéens. Le terme malin a été employé en raison des possibilités d'extension.</p>                                  |                    |

#### 4.6- Résistance aux antibiotiques : [69]

La phase d'industrialisation de la production des antibiotiques a pu faire croire dans les années 1950 à 1960 à l'éradication des maladies infectieuses bactériennes.

Malheureusement, très vite sont apparus des échecs thérapeutiques dus à des souches devenues résistantes alors qu'elles sont habituellement sensibles. Plus tard sont apparues les poly-résistances, bien plus grave encore, car elles limitent considérablement les possibilités de traitement.

La résistance de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* est représentée dans le tableau 6

|  |   |   |
|--|---|---|
| $\beta$ - lactamines<br>Pénicilline anti-Pseudomonas<br>Céphalosporine | Inhibent la formation de ponts peptidiques au niveau de la paroi cellulaire.    | B-lactamase plasmidique,<br>B-lactamase chromosomique<br>diminuent l'affinité des protéines liant la pénicilline      |
| Aminosides (Tobramycine,<br>Gentamycine)                               | Inhibent la synthèse protéique en agissant au niveau de l'unité ribosomique 30S | Enzymes modifiant les aminosides ; altération de la structure du ribosome ; diminution de la capacité des aminosides. |
| Quinolones (Ciprofloxacine)  | Inhibe l'ADN gyrase   | Mutation au niveau de l'ADN gyrase ; altération des protéines de la membrane externe.                                 |

**Tableau 6** : La résistance de *Pseudomonas aeruginosa* aux antibiotiques

**5- *Escherichia coli*:**

### 5.1- Historique :

Isolée pour la première fois par Escherich en 1885, *Escherichia coli* est l'espèce bactérienne qui a été la plus étudiée par les fundamentalistes pour des travaux de physiologie et de génétique. Cette bactérie est connue depuis longtemps comme commensale du tube digestif et pathogène pour l'appareil urinaire.

Le rôle de certaines catégories d'*Escherichia coli* dans les syndromes diarrhéiques a été précisé et les mécanismes de ce pouvoir pathogène ont été analysés [60].

### 5.2- Habitat :

*Escherichia coli* est un hôte normal de l'intestin : Il représente près de 80 % de la flore intestinale aérobie de l'adulte on peut les retrouver également au niveau de diverses muqueuses chez l'homme et chez les animaux.

Sa présence dans le milieu environnant ou dans les aliments est signe de contamination fécale [70].

### 5.3- Caractéristiques biochimiques:

Les caractéristiques biochimiques de l'espèce *Escherichia coli* sont représentées dans le tableau 7

**Tableau 7** : profil biochimique : *Escherichia coli* [71].

| Genre              | <u><i>Escherichia coli</i></u> |
|--------------------|--------------------------------|
| caractères         | Espèce type                    |
| Mobilité           | +                              |
| Gaz en glucose     | +                              |
| Lactose            | +                              |
| $\beta$ gal        | +                              |
| Mannitol           | +                              |
| Saccharose         | + ou -                         |
| RM                 | +                              |
| VP                 | -                              |
| Indole             | +                              |
| Uréase             | -                              |
| H <sub>2</sub> S   | -                              |
| LDC                | + ou -                         |
| ODC                | + ou -                         |
| ADH                | -                              |
| TDA                | -                              |
| Citrate de Simmons | -                              |

(+): présence, (-) : absence

## **5.4- Pouvoir pathogène naturel:**

### **5.4.1- Infections extra-intestinales:**

- **Infections urinaires** : infection ascendante ou descendante, vésicale ou rénale, *E.coli* est tenu pour responsable de 60 à 80 % des infections des voies urinaires.

- **Prostatique; Génitales ; Hépatobiliaires ou digestives ; Méningées** (surtout chez les nouveau-nés) ; **Septicémiques** (le plus souvent secondaires à un foyer infectieux urinaire, biliaire, intestinal, gynécologique ou à une exploration instrumentale) [70].

### **5.4.2- Infections intestinales :**

Les propriétés des types de *Ecoli* responsables de diarrhées sont représentées dans le tableau 8

#### **- *Escherichia coli* entéro-pathogènes (ECEP) :**

Ces souches étaient responsables de diarrhées infantiles graves ou toxiques survenant par épidémies dans des crèches ou des maternités. Ces souches encore appelées *E.coli* G.E.I responsable de gastro-entérites infantiles dues à des colibacilles entéro-pathogènes.

#### **- *Escherichia coli* entéro-toxinogènes (ECET) :**

Elles sont responsables de diarrhées très liquides survenant dans les pays en développement. Ces diarrhées s'observent aussi chez les voyageurs, elles sont souvent épidémiques chez les enfants de ces pays.

#### **- *Escherichia coli* entéro-invasifs (ECEI) :**

Elles sont isolées de syndromes dysentériques tant chez l'adulte que chez l'enfant. La présence de leucocytes dans les selles est le témoignage du processus invasif.

#### **- *Escherichia coli* entéro-hémorragiques (ECEH) ou producteurs de vérotoxines (VTEC) :**

Elles sont responsables d'épidémies de diarrhées aqueuses puis hémorragiques, ces souches sont responsables du syndrome hémolytique-urémique.

#### **- *Escherichia coli* entéro-agrégatifs (ECEAg) :**

Ils peuvent être responsables de diarrhée persistante.

#### **- *Escherichia coli* à adhésion diffuse (ECAD) :**

Ces deux dernières classes d'*E.coli* entérovirulent ont un rôle encore controversé dans la survenue de syndromes diarrhéiques. Les différents syndromes cliniques sont dus à des

*E.coli* différentes, on reconnaît aujourd’hui au moins 4 types de souches responsables de diarrhées [60] [70].

**Tableau 8** : propriétés des *E.coli* responsables de diarrhées [60].

| <i>E.coli</i>          | Entéro-pathogènes (ECEP)                     | Entéro-hémorragiques (ECEH)           | Entéro-toxiques ECET            | Entéro-invasifs ECEI                                |
|------------------------|--|---------------------------------------|---------------------------------|---|
| <b>Diarrhées Cible</b> | Aigue et chronique<br>Enfants moins de 1 ans | Sanglante<br>Intoxication alimentaire | Liquide<br>Enfants et voyageurs | Dysentérique<br>Adultes et intoxication alimentaire |

### 5.5- Pouvoir pathogène pour l’animal:

Certaines souches d’*E.coli* productrices de toxines ou possédant des propriétés invasives sont pathogènes pour les animaux et provoquent des diarrhées, ces diarrhées sont, par leur fréquence et la mortalité qu’elles entraînent, causes de pertes économiques importantes [60].

## **6-LES ANTIBIOTIQUES :**

### **6.1- Introduction :**

Le premier antibiotique fut découvert dès 1896 par Gosio (cité par Hacène, 1992)[72]. Cet antibiotique, l'acide mycophénolique, s'est révélé être actif contre la bactérie pathogène responsable de la maladie du charbon, *Bacillus anthracis*.

Bien plus tard, Fleming (1929) [73] a mis en évidence l'action antagoniste de la pénicilline produite par *Penicillium notatum* et dont l'intérêt thérapeutique a ouvert la voie à d'autres recherches qui ont aboutit entre 1944 et 1960 à des centaines d'antibiotiques qui sont actuellement parmi les plus connus..

### **6.2-Définition :**

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires. Dans la majorité des cas, leur synthèse débute à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et le début de la phase stationnaire (idiophase) (Bu'Lock, 1965)[74]. Cette phase de synthèse démarre lorsqu'un ensemble de condition est rempli : précurseurs disponibles, non inhibition des enzymes impliqués dans ce métabolisme, résistance à l'antibiotique, carence en certain composant du milieu, sources de carbone, d'azote et d'éléments minéraux adéquats, ainsi que l'oxygénation, le pH (Dumenil et Sanglier, 1989)[75].

### **6.3- Classification des antibiotiques :**

Les antibiotiques peuvent être classés d'après plusieurs critères : spectre d'action, type d'action, origine, mode d'action ou structure chimique (Asselineau et Zalta, 1973) [50].

Ils peuvent être bactéricides, sur les bactéries en voie de croissance uniquement (pénicillines, céphalosporines) ou en phases exponentielle et stationnaire (polymyxines, streptomycine), ou encore bactériostatiques (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine).

Ils peuvent être d'origine fongique (pénicillines, céphalosporines, griseofulvine), bactérienne (bacitracine, polymyxines) ou actinomycétale, surtout *Streptomyces* (la majorité des antibiotiques).

D'après leur charge électrique, les antibiotiques peuvent être à caractère acide (pénicilline, cephalosporine, novobiocines) ou neutre.

Leur mode d'action est diversifié: sur la paroi bactérienne (pénicilline, cyclosérine, novobiocine), la membrane plasmique (polymyxines, tyrothricine, polyènes), les acides

nucléiques (mitomycine, actinomycine), la synthèse protéique (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine).

Cependant, il apparaît plus logique de classer les antibiotiques d'après leur structure chimique, cette classification est représentée dans le tableau 9. Près de 7000 molécules actives ont ainsi été classées par Berdy et al. (1987) [76] dans 9 familles et plusieurs sous-familles.

Les antibiotiques actuels peuvent être groupés en plusieurs familles possédant un certain nombre de caractères communs : composition chimique, origine apparentée, spectre d'action similaire, mécanisme d'action identique [77]. Les familles d'antibiotiques sont représentées dans le tableau 10.

**Tableau 9** : Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Berdy et al., 1987)[76].

| FAMILLES  | PRINCIPALES SOUS-FAMILLES                        | EXEMPLES                               |
|---|--|--|
| 1- Antibiotiques contenant des glucides                 | Aminoglycosides                                  | streptomycine, gentamycine, kanamycine |
|   | Glucides purs                                    | nojirimycine                           |
|   | Glycopeptides                                    | vancomycine, ristocétine               |
|   | Sucres lipidiques                                | moenomycine                            |
| 2-lactones macrocycliques                               | Macrolides                                       | érythromycine, spiramycine             |
|   | Polyènes   | nystatine, amphotéricine               |
|   | Macrolactames                                    | riphampicine, maytancine               |
| 3-quinones et antibiotiques similaires                  | Tétracyclines, anthracyclines et anthranquinones | tétracycline, adriamycine, hedamycine  |
|   | Naphtoquinones                                   | rubromycine                            |
|   | Benzoquinones                                    | mitomycine                             |
| 4-acides aminés et peptides                             | Dérivés d'acides aminés                          | pénicilline, cyclosérine               |
|   | Homopeptides                                     | bacitracine                            |
|   | Peptides   | valinomycine                           |
|   | Lipopeptides                                     | Polymexines                            |
| 5- antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote   | Hétérocycles non accolés                         | mildiomycine                           |
|   | Hétérocycles accolés                             | phénazine                              |
| 6- antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygene | Dérivés du furane                                | aflatoxine                             |
|   | Polyéthers                                       | monensine, nigérocine                  |
| 7- antibiotiques alicycliques                           | Dérivés du cyclo-alcanes                         | cycloeximide                           |
|   | Téropènes  | acide marasmique                       |
|   | Oligoterpènes                                    | aside fusidique                        |
| 8-antibiotiques aromatiques                             | Dérivés du benzène                               | chloramphenicol                        |
|   | Composés aromatiques à cycles accolés            | griséofulvine                          |
|   | Aromatique éthers                                | zinninol                               |
|   | Aromatiques glycosylés                           | hygromycine A, novobiocine             |
| 9- antibiotiques aliphaïtiques                          | Dérivés d'alcanes                                | elaiomycine                            |
|   | Dérivés des acides carboxyliques aliphaïtiques   | cerulenine                             |
|   | Composés contenant du phosphore                  | fosfomycine                            |

Tableau 10: les différentes familles d'antibiotiques [78].

| Familles  | Dénomination commune   | Nom de spécialité   |
|---|--|---|
| <b>B -lactamines</b><br><b>Pénicillines</b>   |  |   |
| <b>Pénicilline G, V</b>   | PénicillineV<br>Ampicilline, Amoxicilline  | Oracilline<br>Totapen , Clamoxyl  |
| <b>PénicillineA</b>   |  |   |
| <b>Carboxypénicilline</b>   | Ticarcilline   | Ticarpen  |
| <b>Céphalosporines</b><br>De 1 <sup>er</sup> génération<br>De 2 <sup>ième</sup> génération<br>De 3 <sup>ième</sup> génération<br>De 4 <sup>ième</sup> génération<br>De 6 <sup>ième</sup> génération | Céfalotine, céfalexine<br>Céfoxitine, Céfuroxine<br>Céfotaxine, Céftriaxone<br>Céfprome, Céfepime<br>Cefsulodine | Keflin, keforal<br>Mefoxine, Zinnat<br>Claforan, Rocéfine<br>Céfrom, Axepim<br>Pyocéfal |
| <b>Carbapénèmes</b>   | Imipénème-cilastatine  | Tiénam  |
| B-lactamines<br>Monocycliques   | Aztréonam  | Azctam  |
| <b>Peptides</b><br><b>Glycopeptides</b>   | Vancomycine, Teicoplanine  | Vancocine vancomycine,<br>targocid  |
| <b>Polypeptides</b>   | PolymyxineB  | Colistine   |
| <b>Aminoglycosides</b>  | Streptomycine, kanamycine, néomycine<br>gentamycine, amikacin  | Streptomycine,<br>Kamycine, Amiklin<br>Néomycine, Gentalline                            |
| Groupes des M.L.S<br><b>Macrolides</b>  | Erythromycine, spiramycine   | Erythrocline, Rodogyl   |
| <b>Lincosamides</b>   | Lincomycine, clindamycine  | Lincocline, Dalacine  |
| <b>Synergistines</b><br>(streptogamines A et B)   | pristinamycine M et S  | Quinupristine+dalfopristine<br>synercid   |
| <b>Quinolones</b>   | Acide nalidixique, oxonilique  | Negram, Urotrate  |
| <b>Fluoroquinolones</b>   | Péfloxacine, lévofloxacine   | , Péflacine, Tavinic  |
| <b>Phénicoles</b>   | Chloramphénicol  | Tifomycine  |
| <b>Tétracyclines</b>  | Doxycyline, chortéacycline   | Vibramiycine, Tetramig  |
| <b>Sulfamides</b>   | Sulfaméthisol  | Rufol   |
| <b>Rifamycines</b>  | Rifampicines   | Rifadine  |

#### **6.4-Les mécanismes envisageables pour mener une action antibactérienne [79] :**

On peut distinguer cinq mécanismes distincts par lesquels les substances antibactériennes pourraient agir:

##### **6.4.1-Perturbation du métabolisme cellulaire (antimétabolites):**

Ces composés inhibent le métabolisme du microorganisme ciblé mais pas celui de l'hôte, pour ce faire il bloque une réaction enzymatique catalysée qui doit se réaliser dans la cellule bactérienne mais non dans la cellule animale, exemple : les Sulfamides.

##### **6.4.2-Inhibition de la synthèse de la paroi des cellules bactériennes:**

Cette action aboutit finalement à la lyse (éclatement) de ces cellules exemple: Les Pénicilline, les Céphalosporines. Comme les cellules animales ne possèdent pas de paroi ces substances n'exercent aucune action sur elles.

##### **6.4.3-Interaction avec la membrane plasmique:**

Ces substances interagissent avec la membrane plasmique des cellules bactériennes en modifiant leur perméabilité, ceci entraîne des conséquences fatales pour ces cellules exemple de ces substances : les Polymexines, Tyrothricines.

##### **6.4.4-Perturbation de la synthèse protéique :**

Le fait d'entraver la synthèse protéique dans une bactérie signifie que les enzymes indispensables à la survie de cette cellule ne peuvent plus être fabriqués, exemple de ces substances ayant ce type d'action antibactérienne : Rifampicine, Tétracycline, Chloramphénicol.

##### **6.4.5-Inhibition de la transcription et de la réplication de l'ADN:**

Le dérèglement du fonctionnement de l'ADN empêche la cellule de se diviser Et/ou la synthèse des indispensables enzymes, exemple de ces substances : Acide nalidixique, Proflavine. Les différents mécanismes d'action des antibiotiques sont résumés dans le tableau 11.

**Tableau 11** : Résumé des mécanismes d'action des antibiotiques [80]

| Antibiotiques                                 | Mécanismes   | Bacteriostase | Bactericidie |
|---|--|---------------|--------------|
| $\beta$ -lactamines                           | <b>Inhibition de la synthèse du péptidoglycane</b>   |               |              |
| Glycopeptides                                 | Inhibition des PLP (activité transpeptidase), par analogie structurale du cycle $\beta$ -lactame avec le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du précurseur disaccharide-pentapeptide. |               | +            |
| Fosfomycines                                  | Fixation sur le dipeptide terminal D-Ala-D-Ala du disaccharide pentapeptide empêchant, par encombrement stérique, l'action des transglycosylases.                                | +             |              |
|   | Inhibition de la pyruvyl-trasférase cytoplasmique, qui permet la formation d'acides N-acétyl Muramique.  |               | +            |
| Aminosides                                    | <b>Inhibition de la synthèse protéique</b>   |               |              |
|   | Fixation sur la sous-unité 30S et/ou 50S du ribosome ; inhibition de la translocation du peptide en formation.   |               | +            |
| Tétracyclines                                 | Fixation de la sous-unité 30S du ribosome ; inhibition de la fixation de l'aminocycle -tARN sur son site ribosomal.  | +             |              |
| phénicolos                                    | Fixation sur la sous-unité 50S ; inhibition de la liaison peptidique.  | +             |              |
| Macrolides<br>Lincosamides<br>Streptogramines | Fixation sur la sous-unité 50S ; inhibition de la fixation de l'aminocycle-tARN, de la liaison peptidique, ou de la translocation.   | +<br>+<br>+   | +<br>-<br>-  |
| Polymyxines                                   | <b>Altération des membranes</b>  |               |              |
|   | Désorganisation membranaire par fixation sur les phospholipides des membranes externes et cytoplasmiques.  |               | +            |
| Quinolones                                    | <b>Inhibition de la synthèse des acides nucléiques</b>   |               |              |
|   | Formation d'un complexe ADN-Gyrase-Quinolone ; arrêt de la synthèse de l'ADN.  |               | +            |
| Triméthoprime<br>sulfamides                   | Inhibition de la synthèse des folates, précurseur des bases puriques.  | +<br>+        |              |
| Rifamycines                                   | Inhibition de la synthèse des ARN messagers par fixation sur l'ARN polymérase.   | +             | +<br>-       |
| Nitroimidazolés                               | Fixation sur l'ADN et fragmentation.   |               | +<br>-       |

## **6.5-Résistances bactériennes aux antibiotiques [80] :**

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est un phénomène dont l'étude peut être effectuée sur différents plans.

La capacité pour une souche de se multiplier dans une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe la majorité de souches appartenant à la même espèce, est la définition bactériologique de la résistance, Cette capacité est liée à un ou plusieurs mécanismes biochimiques qui impliquent l'étude des interactions entre l'antibiotique et les voies métaboliques de la bactéries.

Le support génétique de la résistance caractérise en quelque sorte la souche :

- résistance naturelle caractéristique de l'espèce.
- résistance acquise définissant des populations variées au sein d'une espèce.
- Enfin, le dernier aspect de la résistance est son éventuelle expression clinique

La résistance d'une souche bactérienne à un antibiotique est un caractère qui confère à cette Souche la capacité de cultiver en présence d'une concentration « élevée » (ou inhabituelle) d'antibiotique.

## **6.6-Origine du phénotype de résistance aux antibiotiques chez les bactéries [62] :**

La figure n°6 montre quelques mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries.

On connaît actuellement deux mécanismes génétiques pour qu'une bactérie devient résistante vis-à-vis d'un antibiotique. [62]

### **6.6.1- Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'une mutation :**

Les bactéries se multiplient à une cadence tellement rapide qu'il y a toujours une chance d'assister à une mutation qui peut rendre les bactéries résistantes à tel médicament.

De nombreux mutants sont probablement détruits par les mécanismes naturels de résistances de l'hôte, mais lorsqu'un patient est traité massivement par des antibiotiques, quelques mutants résistants peuvent survivre et se multiplier en raison de leur avantage compétitif sur les souches sensibles, car l'antibiotique détruit les bactéries sensibles qui pourraient habituellement concurrencer les souches résistantes. La conséquence peut en être l'émergence de germes pathogènes résistants.

-Le taux de mutation vers la résistance varie selon les antibiotiques et du type d'infection.

### **6.6.2- Acquisition d'une résistance vis-à-vis de certains médicaments à la suite d'un transfert de gène de résistance entres bactéries:**

Dans ce cas la résistance est due à un phénomène d'addition d'information génétique permettant à la bactérie d'acquérir de nouveaux caractères : cette information est portée par des plasmides (plasmides R) mais aussi par des gènes mobiles: les transposons.

### **6.7-Mécanismes de résistance aux antibiotiques chez les bactéries [81] :**

Il existe 3 principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques.

#### **6.7.1-Inactivation de l'antibiotique (détoxification enzymatique de l'antibiotique) :**

- Enzyme modifiant l'antibiotique.

Exemple : chez les bactéries à Gram positif, comme chez les bactéries à Gram négatif, la résistance aux  $\beta$ -lactamines est souvent due à la production d'enzymes inactivant ces antibiotiques ( $\beta$ -lactamase).

Ces enzymes hydrolysent les  $\beta$ -lactamines avec ouverture du cycle  $\beta$ -lactame, et production de dérivés inactifs [82].

#### **6.7.2-Réduction de la perméabilité de l'antibiotique:**

- Diminution de l'absorption de l'antibiotique.
- Rejet de l'antibiotique.

Exemple : la modification de la perméabilité de la bactérie aux sulfamides [82].

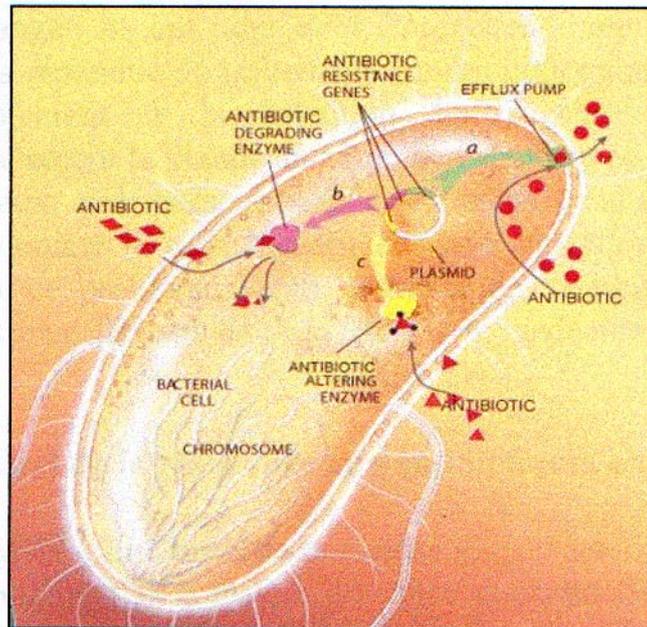
#### **6.7.3-Modification de la cible de l'antibiotique:**

- Changement de la sensibilité de la cible vis à vis de l'antibiotique.
- Nouvelle cible produite non sensible à l'antibiotique.
- Superproduction de la cible.

Exemple : la résistance à la rifampicine est déterminée par une mutation chromosomique, responsable d'une altération de la cible de l'antibiotique [82].

#### **6.7.4 – Développement d'une autre voie métabolique :**

- une autre voie métabolique suppléant la voie métabolique inhibée par l'antibiotique.



**Figure 6:** Quelques mécanismes de résistance aux antibiotiques développés par les bactéries.

### 6.8-Facteurs favorisant l'apparition des phénotypes de résistance chez les bactéries [82] :

Une utilisation inadéquate des antibiotiques lors du traitement a un impact sur le phénomène de résistance aux antibiotiques. (Selon les données rapportées par le Conseil canadien sur la résistance aux antibiotiques par exemple, 51 % des 66 419 ordonnances rédigées pour les enfants canadiens d'âge préscolaire n'étaient pas nécessaires!). Cette situation alarmante pourrait s'expliquer en partie par le fait que:

- Certains médecins cèdent à la pression du patient qui désire un traitement pharmaceutique immédiat
- La prescription ; Prescrire un antibiotique pour une infection virale ou prescrire inutilement un antibiotique à large spectre d'action sont aussi des situations illustrant un usage inadéquat d'antibiotiques.
- L'arrêt d'un traitement antibiotique a comme conséquence de favoriser la prolifération des bactéries plus fortes qui n'ont pas été éliminées dans l'organisme. Certaines bactéries qui développent une résistance à un antibiotique ont la capacité de résister à un autre antibiotique. C'est ce qu'on appelle la résistance métilse.

• Le recours intensif à des antibiotiques dans l'élevage animal industriel contribue également au phénomène de résistance. Ajoutés dans l'alimentation animale, ils ont pour effet d'accroître le rendement en viande. Cette pratique très répandue de traitements antibiotiques sur une longue durée conduit inévitablement à la sélection de bactéries multirésistantes. Contaminant directement la viande au cours de l'abattage ou éliminées du tube digestif des animaux, elles passent dans les effluents, l'eau et l'alimentation et viennent ainsi coloniser le tube digestif des hommes (flore intestinale). Un moyen de pallier ce problème serait d'utiliser des antibiotiques ayant des mécanismes d'action différents de ceux utilisés en médecine humaine.

### **6.9-Mode de transfert de la résistance aux antibiotiques chez les bactéries :**

La figure n°7 montre les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries.

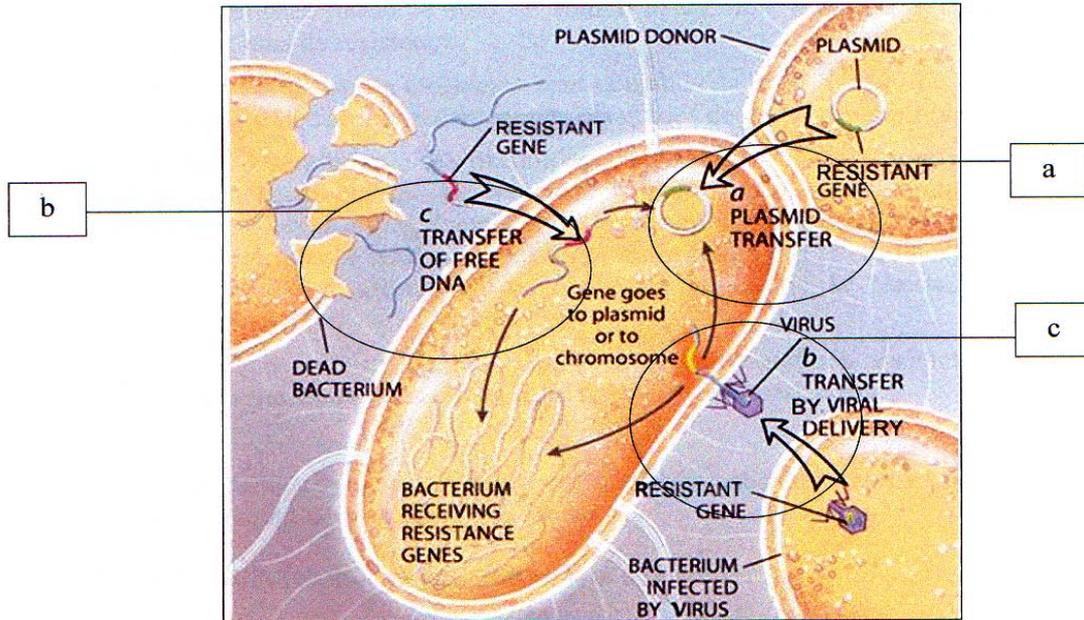
Le passage de l'ADN d'une bactérie donneuse à une bactérie receveuse peut se faire de trois manières :

-Le transfert dit entre deux bactéries ayant établi temporairement un contact physique (conjugaison).

- le transfert d'ADN nu (la transformation) et le transport d'ADN bactérien par des bactériophages (transduction) [62].

-Le transfert de gènes par le processus de transformation a lieu dans le sol et dans des environnements marins, il représente une voie importante d'échanges génétiques dans la nature [62].

La transduction peut s'observer chez un grand nombre de bactéries et de phages et on pense qu'elle joue un rôle significatif dans le transfert de matériel génétique dans la nature. [81]



**Figure 7** : les modes possibles de transfert de l'information génétique entre les bactéries :  
a) conjugaison, b) la transformation, c) la transduction.

#### 6.10-Le rôle des éléments transposables dans la dissémination des gènes de résistance aux antibiotiques [62] :

Les éléments transposables peuvent contenir des gènes autres que ceux de la transposition ; Par exemple des gènes de résistance aux antibiotiques ou des gènes de toxines. Les plasmides jouent le rôle de source et de cible pour les transposons porteurs de gènes de résistance.

Souvent les gènes de résistance sont contenus dans un transposon et il est donc possible d'acquérir rapidement des plasmides de résistance multiple.

En fait, il semble que les plasmides à résistances multiples sont souvent produits par accumulation de transposons dans un plasmide unique. Les transposons se déplacent également entre les plasmides et le chromosome, donc les gènes de résistance sont aussi échangés entre plasmides et chromosomes ce qui entraîne une dissémination encore plus grande de la résistance aux antibiotiques.

Le fait que certains de ces plasmides soient transférés aisément entre espèces, favorise encore davantage la propagation de la résistance.

En conséquence, l'existence de ces éléments cause de graves problèmes dans le traitement des maladies infectieuses.

MATERIEL  
ET  
METHODES

## 1- SITE D'ETUDE : [1]

Le parc national d'EL KALA figure Parmi les zones humides les plus importantes du Nord-est Algérien et il renferme des écosystèmes lacustres, dont le lac OUBEIRA situé à 3 Kms à l'Ouest de la ville (La figure 8 montre la situation exacte du lac dans le parc).

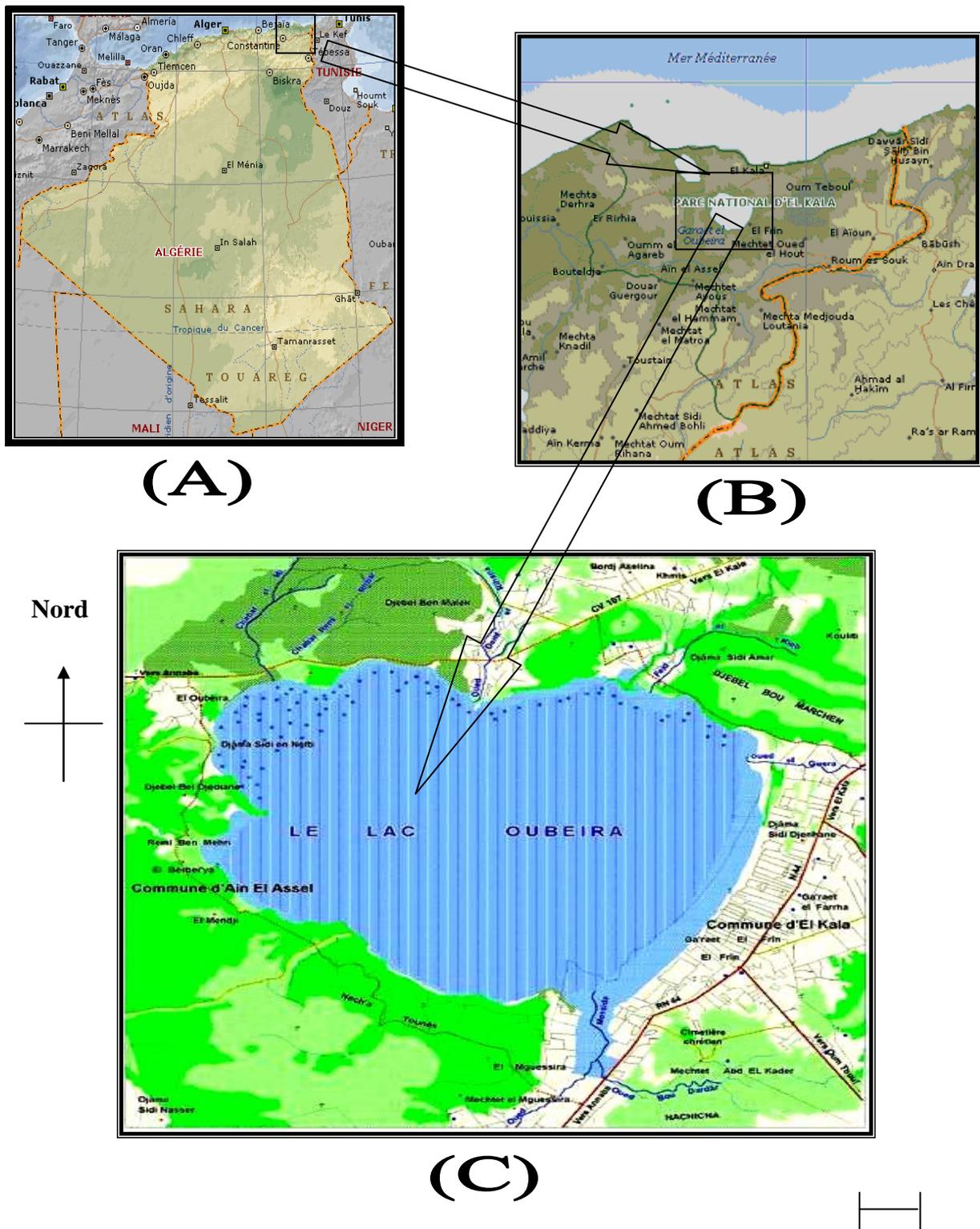


Figure8 : Situation géographique du lac Oubeira d'El Kala [83].

- Figure (A) : Situation géographique du PNEK dans l'Algérie.
- Figure (B) : Situation géographique du PNEK dans le Nord-est Algérien.
- Figure (C) : Situation géographique du lac dans le PNEK.

## 2- ECHANTILLONNAGE :

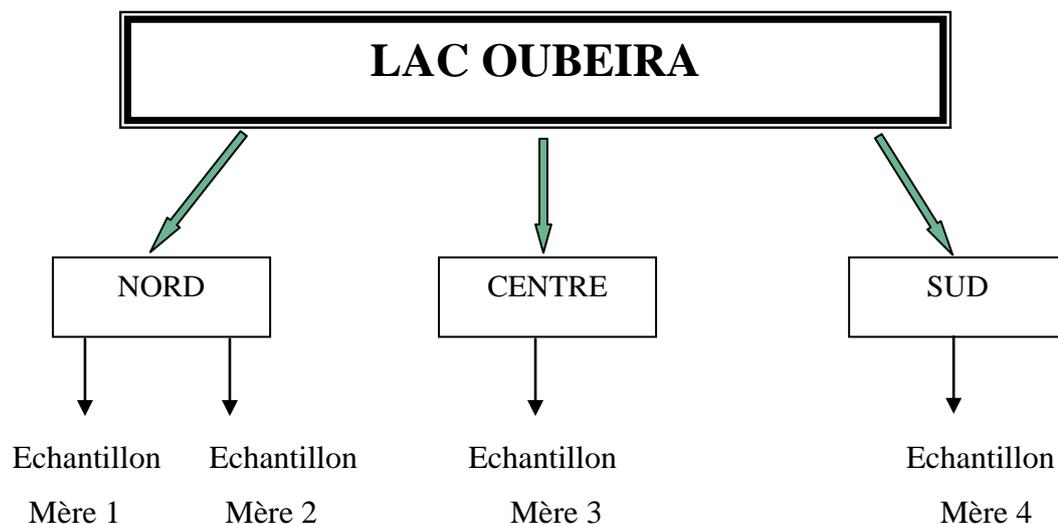
Dans le souci d'obtenir des prélèvements représentatifs de l'eau du lac, nous avons choisi des points de prélèvements en tenant compte des variations des paramètres à mesurer en fonction de la profondeur, de la saison, des vents et des pluies.

Les difficultés rencontrées au moment du prélèvement ont réduit le nombre des échantillons (accessibilité difficile aux différents points).

Nous avons 4 échantillons prélevés de 3 points différents du lac (le Schéma 1 montre la localisation des différents points du prélèvement) :

Deux échantillons ont été prélevés à partir du Nord du lac (à proximité de l'agglomération « rejets » ce qui le rend très exposé aux facteurs favorisant la prolifération des microorganismes).

- EM1 : prélevé à partir du Nord du lac (profondeur : 1mètre, bordé par des forêts de chêne liège).
- EM2 : prélevé à partir du Nord du lac pour le traité à 50°C pendant 10min, en vue de sélectionner les souches thermophiles et thermotolérantes [84].
- EM3 : prélevé à partir du centre du lac (profondeur : 2,5mètre).
- EM4 : prélevé à partir du Sud du lac (profondeur : 1,8 mètre, bordé par des forêts d'aulne et de frêne).



**Schéma 1** : Localisation des différents points du prélèvement.

### **3- PRELEVEMENT : [85]**

Le prélèvement des échantillons d'eau a été réalisé manuellement au niveau de chacun des 3 sites choisis. Les échantillons sont prélevés dans des flacons de 1,5 litres, en verre (préalablement lavés et soigneusement rincés pour éliminer toute trace d'un éventuel détergeant, séchés et stérilisés à l'autoclave 121°C pendant 20mn) puis remplis, laisser renouveler plusieurs fois le contenu, en suite fermer hermétiquement sans laisser de bulles d'air dans les flacons. Il est indispensable de noter sur chaque échantillon la date, l'origine et la nature de l'eau (étiquetage).

Les flacons sont transportés au cours de la même journée dans une glacière (4°C) jusqu'au moment de l'analyse.

### **4- ANALYSES DES ECHANTILLONS MERES :**

#### **4-1 Analyses physico-chimiques :**

##### **4-1-1- Mesure du pH :**

Le pH des différents échantillons est mesuré in situ à l'aide d'un pH-mètre digital de terrain préalablement étalonné à pH 4,7 et 10 [86].

##### **4-1-2- Mesure de la température : [86]**

La température de l'air et de l'eau de chacun des 3 sites du lac est mesurée à l'aide d'un thermomètre de terrain.

##### **4-1-3- Mesure de la conductivité électrique (CE) norme AFNOR T 91-031[86] :**

La mesure de la CE réalisée à l'aide d'un conductimètre de préférence à la température de référence de 25°C et calculée selon l'équation suivante :

$$CE = CE \text{ lue} \times F(t) / K$$

CE : conductivité électrique.

F (t) : facteur température.

K : constante= 0,63.

## 5- ISOLEMENT ET PURIFICATION :

### 5-1 Dilution : [85]

#### 5-1-1- Préparation des dilutions décimales :

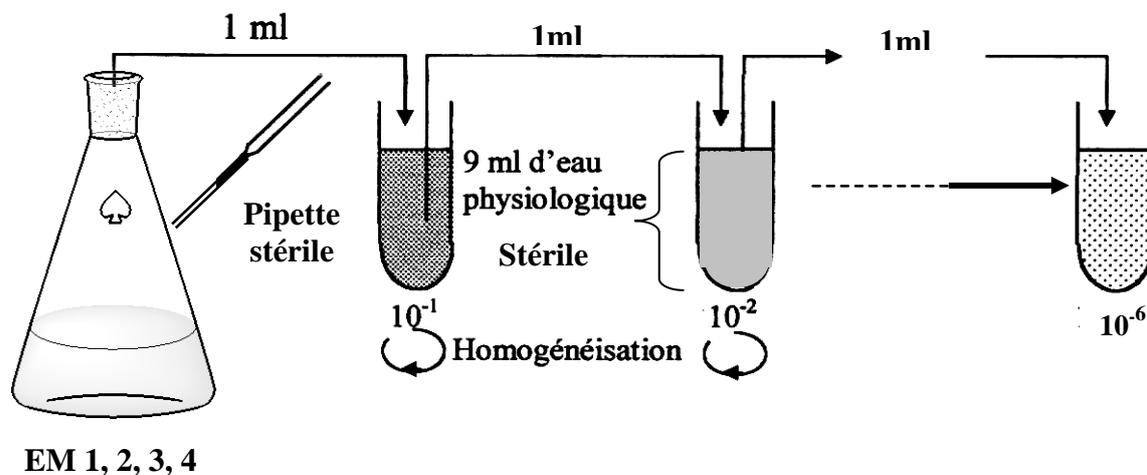
- **But :**

La dilution diminue la charge microbienne de l'échantillon d'eau à analyser et a pour but une lecture plus aisée des colonies bien séparées obtenues en culture mixte [85].

- **Principe :**

La technique des dilutions décimales est représentée dans le schéma 2.

La dilution décimale consiste à diminuer la densité de l'eau en micro-organismes, d'abord au 1/10 (9ml d'eau physiologique stérile) puis au 1/100 et ainsi de suite jusqu'à réduire la concentration microbienne de l'échantillon mère [85].



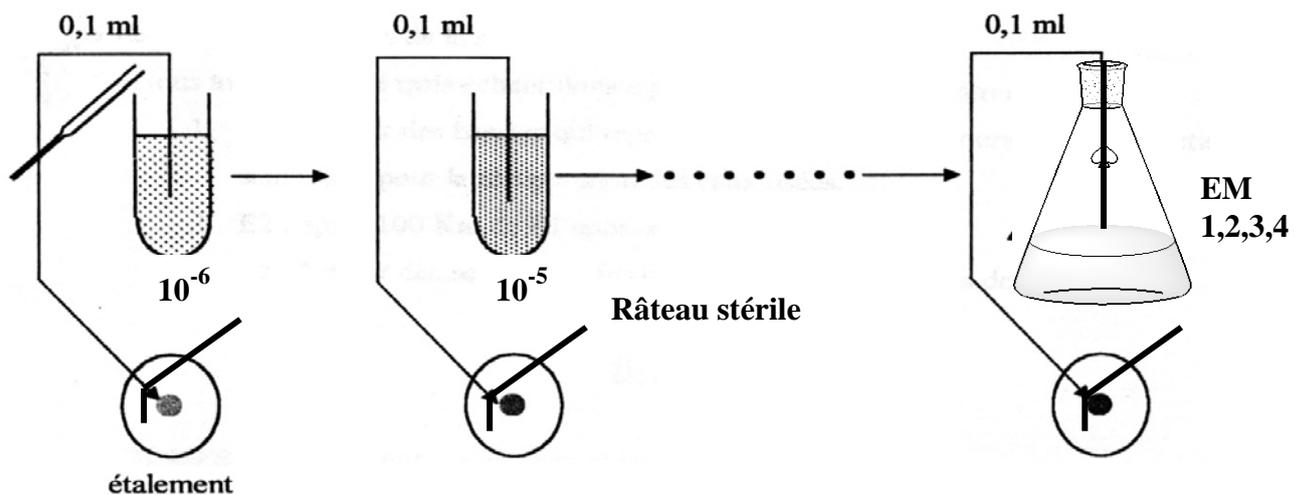
**Schéma 2 :** Technique de Préparation des dilutions décimales.

## 5-2 Ensemencement : [85]

### 5-2-1 Technique :

La technique d'ensemencement est représentée dans le schéma 3

- Après homogénéisation du contenu du tube à essai contenant la suspension la plus diluée, prélever une goutte de cette suspension.
- Déposer la goutte sur la surface du milieu de culture.
- Etaler à l'aide d'un râteau sur toute la surface de la boîte de Pétri (Le râteau en verre est flambé avant et après chaque utilisation).
- Trois (03) boîtes de Pétri sont ensemencées de la manière décrite ci-dessus, pour chaque milieu de culture. La procédure est reprise pour toutes les dilutions préparées, allant du plus dilué au moins dilué, jusqu'à l'ensemencement à partir de l'échantillon mère.



**Schéma 3** : Technique d'Ensemencement.

### 5-2-2 Mise en culture :

Ensemencer un nombre suffisant de boîtes de Pétri contenant les milieux de culture ordinaires, sélectifs et d'autres électifs pour la culture des Actinomycètes.

## 6 -MILIEUX DE CULTURE UTILISES : [87]

Nous avons utilisé des milieux de culture favorables au développement des Actinomycètes :

- la gélose nutritive comme milieu ordinaire.
- milieux d'isolement tels que TGEA, Sabouraud simple, Czapec et Czapec double concentration.
- milieux sélectifs : milieux rendus plus sélectifs par addition d'antibiotiques à large spectre d'action tels le chloramphénicol, l'oxytétracycline et les milieux ISP (International-Streptomyces-Project) préconisés par Shirling et Gottlieb,(1966) [88].
- Milieux électifs : regroupant les milieux de croissance et les milieux de sporulation.

### 6-1- Milieux ordinaires :

#### 6-1-1- Gélose nutritive (GN) [87] [89] [90]:

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Peptone .....            | 10 g    |
| Extrait de viande .....  | 5 g     |
| Chlorure de sodium ..... | 5 g     |
| Agar.....                | 15 g    |
| Eau distillée.....       | 1000 ml |

Un milieu de culture microbienne très favorable à la croissance bactérienne, Le pH de la G-N est de 7,2.

- **Principaux constituants de la GN [90] :**

#### - Peptone :

Un composé polypeptidique extrait de la viande et dont l'aminogramme comporte les éléments suivants à des doses variables de l'ordre de (g/100g) :

Alanine- arginine- acide aspartique- cystine- acide glutamique- glycine- histidine- isoleucine - lysine- méthionine- phénylalanine- proline- serine- thréonine -tryptophane- tyrosine- valine. La GN est constituée de 10g/l de peptone.

La peptone peut également jouer le rôle d'une source secondaire de carbone et d'énergie.

**- Extrait de viande : [90]**

Extrêmement riche en matière nutritionnelle organique et minéral nécessaire à la croissance des microorganismes hétérotrophes. Il rentre dans la composition de la GN avec une concentration de 5g/l.

**- Chlorure de sodium (NaCl):** comme élément minéral [90].

**6-2-Milieus d'isolement :****6-2-1 -Milieu gélosé à base de tryptone, glucose et d'extrait de viande (TGEA) [90] :**

Glucose..... 30 g/l  
 Tryptone .....5 g/l  
 Extrait de viande .....1g/l  
 Agar.....20g/l  
 Eau distillée.....1000ml  
 pH.....pH 7,2

- **Principaux constituants du milieu TGEA [90] :**

**-Glucose :**

Source directe de carbone et d'énergie. Un hexose de forme aldéhyde, parmi les composés les plus classiquement assimilables par les bactéries. Il est d'une concentration assez suffisante ; 30g/l.

**-Tryptone (peptone de caséine) :**

Apporte de l'azote organique au milieu; elle est obtenue par hydrolyse enzymatique contrôlée de la caséine. Elle est de 5g/l dans le milieu TGEA.

**-Extrait de viande (voir GN).**

**6-2-2 -Milieu Sabouraud [87] [91]:**

|                    |         |
|--------------------|---------|
| Glucose .....      | 20 g    |
| Peptone.....       | 10 g    |
| Agar.....          | 20g     |
| Eau distillée..... | 1000 ml |
| pH.....            | 6-6.5   |

C'est un milieu semi synthétique qui contient 20g/l de glucose comme source directe de carbone et d'énergie.

- **Principaux constituants du milieu de Sabouraud [90] :**

- **Glucose (voir TGEA).**
- **Peptone (voir GN).**

**6-2-3 -Milieu Czapek [87] [91] :**

|                              |        |
|------------------------------|--------|
| Saccharose .....             | 30g    |
| Nitrate de sodium .....      | 3g     |
| Phosphate dipotassique ..... | 1g     |
| Chlorure de potassium.....   | 0.5g   |
| Sulfate de magnesium.....    | 0.5g   |
| Sulfate de fer.....          | 0.01g  |
| Eau distillée.....           | 1000ml |

Le pH est ajuster à 6-6.5 puis ajouter 20g d' Agar.

Ce milieu est absolument synthétique, présent sous deux formes principales Czapek simple, et double concentration.

- **Principaux constituants du milieu Czapek [90] :**

- **Saccharose :**

Constitue l'unique source de carbone et d'énergie; la molécule est un dioside composé de deux unités d'hexose, le glucose (aldose) et le fructose (cétose). Le saccharose est de 30g/l dans ce milieu de culture.

**- Nitrate de sodium :**

Une source d'azote minérale [90].

**- Eléments minéraux :**

Présentent des concentrations de l'ordre de  $10^{-2}$  à  $10^{-1}$  de phosphore, est sous forme de phosphate dipotassique ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ); le soufre est à l'état de sulfates en association à des oligoéléments tels que le Magnésium, le Fer, le Cuivre et le Zinc [90].

**6-2-4 - Milieu Czapek double concentration (voir milieu Czapek) [91]:****6-3 -Milieux sélectifs:****6-3-1- Milieu ISP2 [88] [92] :**

Extrait de levure .....4 g  
 Extrait de malt ..... 10g  
 Glucose .....4g  
 Eau distillée .....1000ml  
 Le pH est ajuster à 7,2 puis ajouter 20g d'Agar.

**6-3-2- Milieu ISP 3[88] [92] :**

Farine d'avoine .....20g  
 Solution saline standard.....1 ml  
 Eau distillée.....1000 ml  
 Le pH est ajuster à 7,2 puis ajouter 20g d'Agar.

**-composition de la solution saline standard [88] [93] :**

$\text{FeSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....0.1 g  
 $\text{MnCl}_2, 4\text{H}_2\text{O}$ .....0.1 g  
 $\text{ZnSO}_4, 7\text{H}_2\text{O}$ .....0.1 g  
 Eau distillée .....1000 ml  
 Cette solution est ajoutée aux milieux ISP3, ISP4, ISP 5 à raison de 1ml/1000ml.

**6-3-3- Milieu ISP 4**[88] [93] :

|   |         |
|---|---------|
| Amidon.....   | 10 g    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....                 | 1 g     |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....            | 1 g     |
| NaCl.....   | 1 g     |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ..... | 2 g     |
| CaCO <sub>3</sub> .....                               | 2 g     |
| Solution saline standard .....                        | 1 ml    |
| Eau distillée.....                                    | 1000 ml |

Le pH est ajuster à 7,2 puis ajouter 20g d'Agar.

**6-3-4 - Milieu ISP5: glycerol - asparagines-agar** [88] [93]:

|  |         |
|--|---------|
| L-asparagine (anhydre) .....                   | 1g      |
| Glycerol.....                                  | 10g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (anhydre)..... | 1g      |
| Eau distillée.....                             | 1000 ml |
| Solution saline standard .....                 | 1 ml    |

Le pH est ajuster à 7,0-7,4 puis ajouter 20g d'Agar.

**6-3-5 Milieu Tryptone - extrait de levure - glucose (TYG)** [87] :

|                                       |        |
|---------------------------------------|--------|
| Glucose .....                         | 10g    |
| Extrait de levure .....               | 3g     |
| Peptone .....                         | 5g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ..... | 1g     |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ..... | 1g     |
| Eau distillée .....                   | 1000ml |

Le pH est ajuster à 7,2-7,3 puis ajouter 20g d'Agar.

**6-3-6 Milieu gélosé à base de glucose et d'extrait de levure additionné à l'oxytetracycline (OGYA)** [89]:

|                         |        |
|-------------------------|--------|
| Extrait de levure ..... | 5 g    |
| Glucose .....           | 20 g   |
| Agar.....               | 16 g   |
| Oxytetracyline.....     | 0.1g   |
| Eau distillée.....      | 1000ml |
| pH.....                 | 6.5    |

L'OGYA est un milieu sélectif; semi synthétique à base de glucose et d'extrait de levure additionné à l'oxytetracycline (antibiotique à large spectre d'action affectant les Gram+ et les Gram -).

**6-3-7 Milieu Sabouraud – Chloramphénicol [91] :**

|                          |         |
|--------------------------|---------|
| Peptone chapoteaut ..... | 10 g    |
| Glucose massé.....       | 20 g    |
| Chloramphenical.....     | 0.5g    |
| Agar.....                | 20g     |
| Eau distillé.....        | 1000 ml |
| pH.....                  | 6-6.3   |

**6-3-8 Milieu Chitine-Agar [93] :**

|  |        |
|--|--------|
| Chitine (colloïdale).....                  | 4g     |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .....      | 0.3g   |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....      | 0.7g   |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O..... | 0.5g   |
| FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O..... | 0.01g  |
| ZnSO <sub>4</sub> .....                    | 0.001g |
| MnCl <sub>2</sub> .....                    | 0.001g |
| Eau distillée .....                        | 1000ml |

Le pH est ajuster à 7-7,5 puis ajouter 20g d'Agar.

**6-3-9 Milieu asparagine – glucose [93] :**

|                     |        |
|---------------------|--------|
| Glucose .....       | 10g    |
| Asparagine .....    | 0.5g   |
| Eau distillée ..... | 1000ml |

Le pH est ajuster à 7 puis ajouter 15g d'Agar.

**6-4- Milieux électifs :****6-4-1- Milieux de croissance :****6-4-1-1 Milieu dextrose-tryptose-agar [93]:**

Glucose .....10g

Tryptone .....5g

K<sub>2</sub>OPO<sub>4</sub>.....0.5g

Nacl.....0.5g

FeSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O.....0.1g

Eau distillée .....1000ml

Le pH est ajuster à 7-7,2 puis ajouter 20g d' Agar.

**6-4-2- Milieux de sporulation [93]:****6- 4- 2-1- Milieu de Cross [93] :**

Pomme de terre en tranche .....150g

Carotte en tranche ..... 30g

Eau du robinet .....1000ml

Le pH est ajuster à 6.5 puis ajouter 20g d' Agar.

**6-4-2-2 Milieu de Gausse [93] :**KNO<sub>3</sub>.....1gKH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....0.5gMgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0.5g

NaCl.....0.5g

FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....0.01g

Amidon .....20g

Eau distillé.....1000ml

Le pH est ajuster à 7-7.2 puis ajouter 30g d' Agar.

**6-4-2-3 Milieu de Lindenbein [93] :**

|  |        |
|--|--------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....      | 1g     |
| MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O..... | 0.5g   |
| KCl.....                                   | 0.5g   |
| FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O..... | 0.01g  |
| NaNO <sub>3</sub> .....                    | 2g     |
| Glycerol.....                              | 30g    |
| Eau distillée.....                         | 1000ml |

Le pH est ajuster à 7-7.2 puis ajouter 20g d'Agar.

**7- INCUBATION ET LECTURE :**

Nous avons sélectionné trois températures de croissance des actinomycètes :

10 °C, 28°C, 45°C.

- la température de 10°C est la température de l'eau du lac lors du prélèvement.
- La température de 28°C permet une bonne croissance des actinomycètes (température optimale) [87] [88].
- la température de 50°C nous permet de mettre en évidence les actinomycètes thermophiles et thermotolérantes [84] [94].

**Remarque [88] :**

Compte tenu des variations de croissance chez les différentes espèces d'actinomycètes et des différentes compositions des milieux de cultures utilisés, les boîtes mises en culture sont lues à différents intervalles de temps, d'abord 7 jours, 14 jours, 28 jours.

**8- SELECTION ET PURIFICATION DES COLONIES SUSPECTES :****8-1-Sélection des colonies suspectes :**

La sélection des colonies suspectes est basée sur les caractères macromorphologiques spécifiques des Actinomycètes (**voir partie Bibliographique**).

**8-2 Observation microscopique :**

- **Technique [95] :**

-**But :**

Mettre en évidence la forme, Taille, l'arrangement cellulaire et le Gram.

-**Principe :**

Nous avons procédé à la coloration de Gram, une méthode usuelle employée en bactériologie.

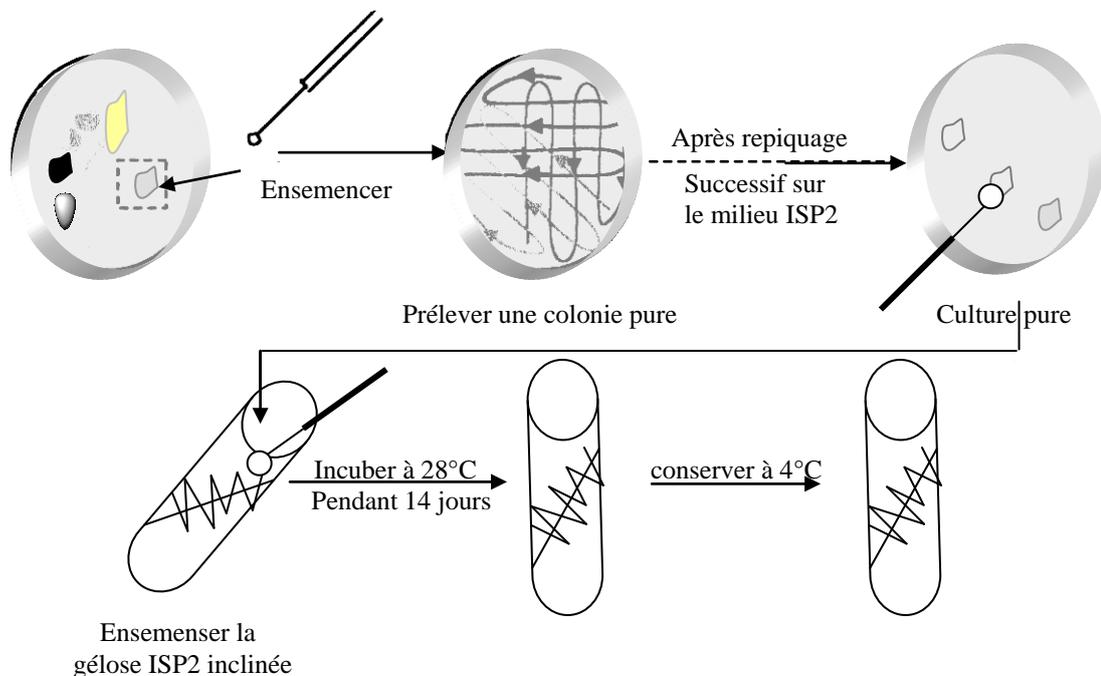
**-Mode opératoire [95] :**

- Dilacérer la colonie bactérienne suspecte dans une goutte d'eau physiologique sur la lame porte-objet;
- Préparer le frottis à la flamme du bec Bunsen;
- Emerger avec du violet de Gentiane pendant 60 secondes;
- Ajouter le Lugol et laisser agir encore 30 secondes;
- Laver la lame à l'éthanol jusqu'à ce que la dernière goutte soit transparente ;
- Laver rapidement à l'eau et recouvrir la lame de fuschine pendant 10 secondes ;
- Rincer à l'eau et sécher les préparations à l'aide du papier buvard ;
- Au moment de l'observation, ajouter une goutte d'huile de cèdre (observation à immersion).
- après l'observation à l'objectif  $G \times 100$  la confirmation se fait en se basant sur les caractères micromorphologiques des Actinomycetes : des filaments fins ou très fins, long parfois court, enchevêtrés ou enroulés, parfois fragmentés présence de spore de très petite taille (**voir partie bibliographique**) [26].

**9- PURIFICATION ET CONSERVATION [88] :**

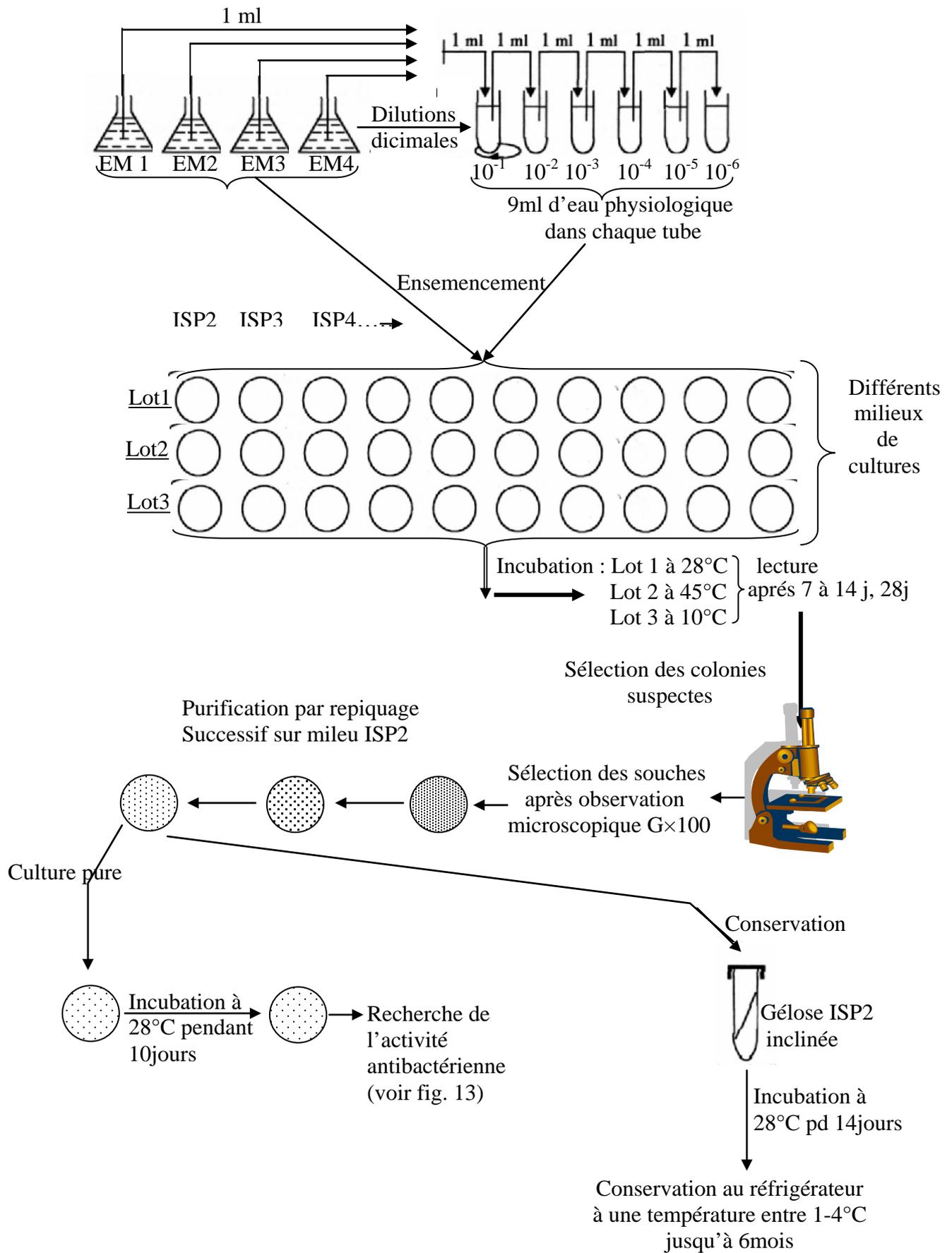
Les techniques de purification et de conservation sont représentées dans le schéma 4

Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement puis purifiées par repiquage successif sur milieu ISP n°2, à base de glucose et d'extraits de malt et de levure. Les isolats sont ensemencés sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés à 28°C pendant 14 à 28 jours, puis conservés à 4°C dans un réfrigérateur.



**Schéma 4:** Technique de Purification et de Conservation.

Nous avons récapitulé les différentes étapes depuis la dilution jusqu'à la conservation dans le schéma 5.



**Schéma 5** : Etapes d'Isolement, Sélection, Purification et Conservation.

---

## **10-RECHERCHE DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE :**

### **10-1 Les souches de références testées :**

Cette partie a été réalisée sur des souches cibles qui présente une simple résistance ou une multirésistance :

- *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub>.
- *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>2</sub> (MRSA).
- *Pseudomonas aeruginosa*. ATCC Y.
- *Escherichia coli* ATCC Z.

#### **10-1-1 Origine :**

Les souches nous ont été fournies par le laboratoire central de bactériologie médicale « CHU BATNA ».

#### **10-1-2 Vérification de la pureté des souches :**

Nous avons vérifié la pureté des souches de référence cibles par observation microscopique.

#### **-But :**

Mettre en évidence la forme, l'arrangement cellulaire, la taille et le Gram [95].

#### **-Mode opératoire [95] :**

- Préparation des frottis des souches de références.
- Coloration de Gram [14].
- observation à l'objectif G×100 (observation à immersion).

#### **10-1-3- Etude des caractères biochimiques des souches cibles :**

L'études des caractères biochimiques des souches de références cibles a été réalisée par l'API système spécifique pour chaque groupe de bactérie (API 20 E, API 20 NE et API Staph).

**10-1-3-1 -Etude des caractères biochimiques de la souche de référence cible :**

*Escherichia coli* ATCC Z :

a -Système API 20 E [96] :

**-But :**

Système de galeries biochimiques standardisées et miniaturisées API 20 E (Bio Merieux), qui permettent l'identification des Enterobacteriaceae et autres bacilles Gram négatif.

**-Principe :**

La galerie API 20 E comporte 20 micro-tubes renferment des substrats sous forme déshydratés. Les différents tubes sont inoculés à l'aide d'une suspension bactérienne de la Bactérie à identifier, qui reconstitue le milieu de réaction. Les réactions produites pendant la durée de l'incubation se traduisent soit par un virage spontané du milieu ou bien par virage révélé par l'addition d'un réactif approprié [96].

**- Mode opératoire : [96]**

Le mode opératoire de la galerie API 20 E est présenté dans la figure 27 (Annexes).

**-Préparation des galeries : [96]**

-Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.

- Incrire la référence de la bactérie sur la languette latérale de la boîte.

-Placer la galerie dans la boîte d'incubation.

**-Préparation de l'inoculum : [96]**

Ouvrir une ampoule de suspension Medium (5ml) et réaliser une suspension homogène avec la colonie isolée sur milieu gélosé.

**-Inoculation de la galerie : [96]**

-Remplir tubes et cupules des tests : CIT, VP et GEL.

-Remplir uniquement les tubes des autres tests.

-Créer une atmosphère anaérobie dans les tests : ADH, LDC, ODC, H<sub>2</sub>S et URE en remplissant leur cupule d'huile de paraffine.

-Refermer la boîte d'incubation et incuber à 37°C pendant 18-24h.

**-Lecture: [96]**

- La lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture (tableau 31 Annexes).
- les réactifs utilisés lors de la lecture sont présentés dans la partie Annexes.

**-Important :** [96]

- (1)-une très légère couleur jaune est également positive.
- (2)-une couleur orange apparaissant après 36-48 h de l'incubation doit être considérée négative.
- (3)-Lecture dans la cupule (zone aérobie).
- (4)-La fermentation commence dans la partie inférieure des tubes, l'oxydation commence dans la cupule.
- (5)-Une légère coloration rose apparaissant après 10 minutes doit être lue négative.

**-Interprétation :** [96]

- Détermination du profil numérique :

Sur la fiche de résultats, les tests sont séparés par groupe de trois et une valeur 1, 2 ou 4 est indiquée pour chacun. En additionnant à l'intérieur de chaque groupe les valeurs correspondant à des réactions positives, on obtient 7 chiffres ; la réaction de l'oxydase qui constitue le 21<sup>ème</sup> test est affectée de la valeur 4 lorsqu'elle est positive.

- Identification : elle est réalisée à partir de la base de données à l'aide du catalogue analytique.

la fiche de résultat du système API 20 E est présentée dans la figure 28(Annexes).

**10-1-3-2 -Etude des caractères biochimiques des deux souches de *Staphylococcus aureus* X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> :**

**a-Recherche de la catalase :** [89]

**But :**

Déférencier les coques Gram positif.

**Principe :**

La catalase est une enzyme qui permet la dégradation du peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) résultant de l'oxydation des hydrogènes transportés par la voie oxydative directe, selon la réaction suivante : [89]



L'oxygène libéré se dégage sous forme gazeuse.

**Technique :** [89]

-Déposer sur une lame propre une goutte d'eau oxygénée à 10 volume et y dissocier directement une anse de culture de la bactérie prélevée sur milieu solide.

**-Lecture :** [89]

Réaction positive : dégagement immédiat de bulles gazeuses.

**Remarque :** [89]

- La recherche de la catalase ne doit pas être réalisée à partir de colonies prélevées sur gélose au sang du fait de l'activité catalasique de ce dernier.

- Après la recherche de la catalase nous avons étudié les caractères biochimiques des deux souches de référence cible *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub> et *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>2</sub> (MRSA) par l'utilisation du système API Staph.

### **b-Système API Staph :**[97]

**-But:**

API Staph est un système standardisé pour l'identification des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus* et *Kocuria*, comprenant des tests biochimiques miniaturisés ainsi qu'une base de données.

**-Principe :**

Le principe est le même que celui de l'API 20E.

**-Mode opératoire :**

Le mode opératoire de la galerie API Staph est présenté dans la figure 29 (Annexes).

**-Préparation de la galerie : (Voir API 20E).**

**-Préparation de l'inoculum :**

- La même que celle de l'API 20E en utilisant le milieu API Staph.

- La Composition du milieu API Staph est présenté dans la partie Annexes.

**-Inoculation de la galerie :( voir API 20 E).**

**-Lecture :** La lecture de la galerie se fait en se référant au tableau de lecture le tableau 32 (partie Annexes).

**-Interprétation :( voir API 20 E).**

La fiche de résultat du système API Staph est présentée dans la figure 30 (Annexes).

### **10-1-3-3 -Etude des caractères biochimiques de la souches de références cible : *Pseudomonas aeruginosa* Y :**

**a-Recherche de l'oxydase :**

La recherche de l'oxydase est l'un des critères les plus discriminatifs et le plus employé dans le diagnostic des bacilles Gram<sup>-</sup>. Ce test simple consiste à mettre en évidence la capacité de la souche à tester à oxyder la forme réduite, incolore de dérivés de N-diméthyl-para-phénylène diamine, en leur forme oxydée semi-quinonique rose violacée. [90]

**-Technique :** [89]

Dans 10 gouttes d'une suspension épaisse de la bactérie à tester, introduire un disque imprégné d'une solution d'oxalate de N-diméthyl-para-phénylène diamine (disque OX BioMérieux).

**-Lecture :**

Coloration violette foncé : bactérie oxydase positif [89].

**Remarque 1 :** [89]

La coloration doit apparaître immédiatement ou après quelques secondes puis noircit. [89]

**Remarque 2 :**

La recherche de l'oxydase ne doit pas être pratiquée à partir de colonies prélevées sur gélose au sang ni avec anse de platine [95].

Après la recherche de l'oxydase chez la souche *Pseudomonas aeruginosa ATCC Y* nous avons étudié les caractères biochimiques par l'utilisation du système API 20 NE.

**b-Système API 20 NE:**[98]

**-But :**

API 20 NE est un système standardisé pour l'identification des bacilles à Gram négatif non enterobactéries et non fastidieux (exemple : *Pseudomonas*, *Acinetobacter*, *Flavobacterium*, *Moraxella*, *Vibrio*, *Aeromonas*.) combinant 8 tests conventionnels, 12 tests d'assimilation.

**-Principe :**

Le principe est le même que celui de l'API 20E.

**-Mode opératoire :**

le mode opératoire de la galerie API20 NE est présenté dans la figure 31 (Annexes).

**-Préparation de la galerie : (Voir API 20E).**

**-Préparation de l'inoculum : (Voir API 20E).**

**-Inoculation de la galerie :( voir API 20 E).**

**-Lecture :** voir le tableau 102 partie Annexes

**-Interprétation :( voir API 20 E).**

la fiche de résultat du système API 20NE est présentée dans la figure 32( Annexes).

#### 10-1-4- Etude de la sensibilité des souches de références cibles aux antibiotiques (Antibiogramme) [99] :

Le schéma 6 montre la technique de l'antibiogramme.

##### -Milieux utilisés

Géloses Muller Hinton (MH), coulées en boîtes de Petri sur une épaisseur de 4mm (Les géloses sont séchées avant emploi).

##### -Milieu Muller-Hinton :

**-Composition :** (g/l d'eau distillée) [89]

- Infusion de viande de bœuf déshydratée.....300g
- Hydrolysate de caséine.....17.5g
- Amidon.....1.5g
- Agar.....17g

pH final : 7.4 ± 0.2

##### -Inoculum : [99]

- A partir d'une culture pure de 18 heures sur milieu d'isolement, racler à l'aide d'une anse de platine quelques colonies bien isolées et parfaitement identiques.

- décharger l'anse dans 5 à 10 ml d'eau physiologique stérile à 0,9%.

- bien homogénéiser la suspension bactérienne, son opacité doit être équivalente à 0,5 Mc Farland (illustré dans le control de l'inoculum) ou à une DO de 0,8 à 0,10 lue à 625nm.

-L'inoculum peut être ajusté en ajoutant soit de la culture s'il est trop faible, ou bien de l'eau physiologique stérile s'il est trop fort.

-L'ensemencement doit se faire dans les 15 minutes qui suivent la préparation de l'inoculum.

##### -Contrôle de l'inoculum [99] :

- Préparer l'étalon 0,5 Mc Farland, en versant 0, 5 ml d'une solution de BaCl<sub>2</sub> hydraté a 1% (10 g/l) dans une éprouvette de 100ml. Compléter a 100 ml avec du H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> à 1% (10 ml/l) Ainsi préparé il doit avoir une DO de 0,08 a 0,1 lue à 625 nm.

- Aliquoter la solution en volumes de 10ml, dans des tubes identiques a ceux qui serviront à la préparation des inoculums (le nombre d'aliquots sera fonction du nombre de manipulateurs).
- Sceller ces tubes de façon à éviter toute évaporation (para film, ruban adhésif).
- Repérer le niveau du liquide à l'aide d'un marqueur, et le contrôler régulièrement en prenant la densité optique.
- Conserver les tubes à température ambiante et à l'abri de la lumière (papier aluminium).
- Homogénéiser le tube étalon avant de le comparer à l'inoculum préparé:  
L'inoculum doit avoir la même turbidité que l'étalon.

**-Ensemencement :** [99]

- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension bactérienne.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube, afin de le décharger au maximum.
- frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosée, sèche, de haut en bas, en stries serrées.
- répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

**-Application des disques d'antibiotiques :** [99]

- Nous avons utiliser un distributeur de disques à raison de 6 disques d'antibiotiques par boite de petri.
- les listes d'antibiotiques recommandés pour le test de sensibilité de chaque souche de référence cible sont reportées sur les tableaux 12,13 et14.
- incuber à 35°C pendant 18 heures.

**-Lecture :** [99]

- Mesurer avec précision, le diamètre des zones d'inhibition à l'aide d'un pied à coulisse métallique.

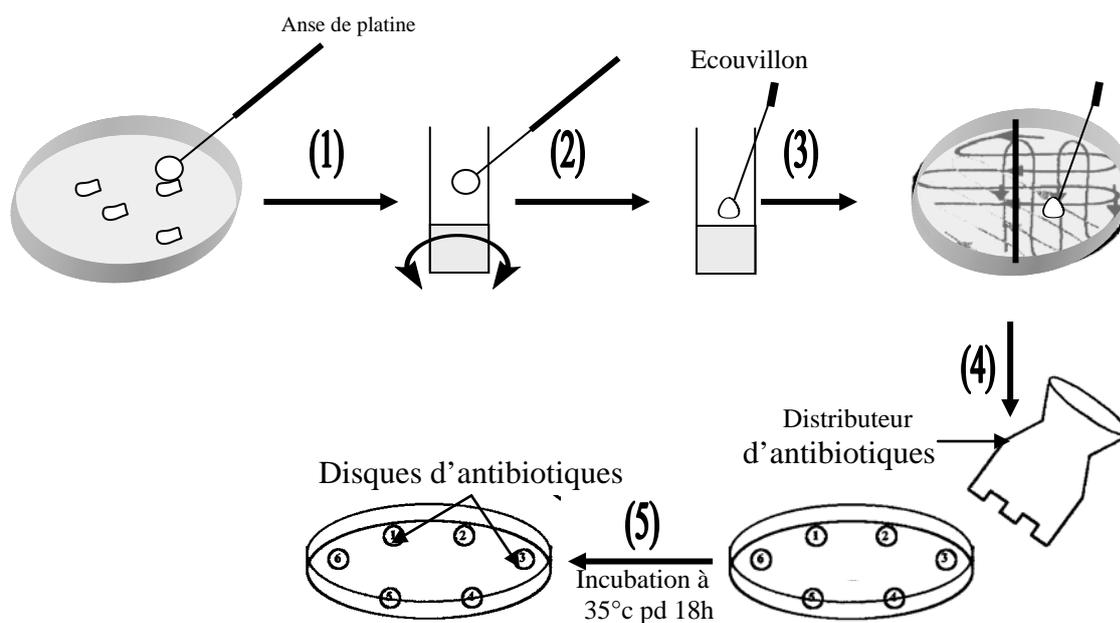


Schéma 6 : Technique de l'antibiogramme.

Tableau 12 : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *staphylococcus sp* [99].

| Antibiotiques testés                             | Charge des Disques | Diamètres critiques en (mm) |               |          |
|--|--------------------|-----------------------------|---------------|----------|
|  |                    | Résistant                   | Intermédiaire | Sensible |
| <b>β-Lactamines</b>                              |                    |                             |               |          |
| Penicilline                                      | 10UI               | ≤28                         | --            | ≥29      |
| Oxacilline                                       | 5 µg               | <20                         | --            | ≥20      |
| Céfoxitine                                       | 30µg               | ≤19                         | --            | ≥20      |
| <i>S.aureus</i><br><i>S à coagulase négative</i> |                    | ≤24                         | --            | ≥25      |
| <b>Aminosides</b>                                |                    |                             |               |          |
| Gentamicine                                      | 10µg               | ≤12                         | 13-14         | ≥15      |
| Amikacine  | 30µg               | ≤14                         | 15-16         | ≥17      |
| <b>Macrolides</b>                                |                    |                             |               |          |
| Erythromycine                                    | 15µg               | ≤13                         | 14-22         | ≥23      |
| Clindamycine                                     | 2µg                | ≤14                         | 15-20         | ≥21      |
| <b>Glycopeptides</b>                             |                    |                             |               |          |
| Vancomycines                                     | 30µg               | --                          | --            | ≥15      |
| Teicoplanine                                     | 30µg               | ≤10                         | 11-13         | ≥14      |
| <b>Quinolones</b>                                |                    |                             |               |          |
| Ofloxacine                                       | 5µg                | ≤14                         | 15-17         | ≥18      |
| <b>Autres</b>                                    |                    |                             |               |          |
| Trimethoprime/sulfamide                          | 1,25/23,75µg       | ≤10                         | 11-15         | ≥16      |
| Rifampicine                                      | 15µg               | ≤16                         | 17-19         | ≥20      |
| Tétracycline                                     | 30µg               | ≤14                         | 15-18         | ≥19      |
| Chloramphenicol                                  | 30µg               | ≤12                         | 13-17         | ≥18      |
| Fosfomycine                                      | 50µg               | <14                         | --            | >14      |

**Tableau 13** : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition *Pseudomonas aeruginosa*[99].

| Antibiotiques testés          | Charge des Disques | Diamètres critiques en (mm) |               |          |
|-------------------------------|--------------------|-----------------------------|---------------|----------|
|                               |                    | Résistant                   | Intermédiaire | Sensible |
| <b>β-Lactamines</b>           |                    |                             |               |          |
| Ticarcilline                  | 75µg               | ≤14                         | --            | ≥15      |
| Ticarcilline +Ac clavulanique | 75/10µg            | ≤14                         | --            | ≥15      |
| Piperacilline                 | 75µg               | ≤12                         | --            | ≥19      |
| Cefazidine                    | 30µg               | ≤14                         | 15-17         | ≥18      |
| Aztreonam                     | 10µg               | ≤15                         | 16-21         | ≥22      |
| Imipineme                     | 10µg               | ≤13                         | 14-15         | ≥16      |
| <b>Aminosides</b>             |                    |                             |               |          |
| Amikacine                     | 30µg               | ≤14                         | 15-16         | ≥17      |
| Gentamycine                   | 10µg               | ≤12                         | 13-14         | ≥15      |
| Tobramycine                   | 10µg               | ≤12                         | 13-14         | ≥15      |
| <b>Tetracyclines</b>          |                    |                             |               |          |
| Tetracycline                  | 30µg               | ≤14                         | 15-18         | ≥19      |
| <b>Quinolones</b>             |                    |                             |               |          |
| Ciprofloxacine                | 5µg                | ≤15                         | 16-20         | ≥21      |
| <b>Autres</b>                 |                    |                             |               |          |
| Trimethoprime/sulfamide       | 1,25/23,75µg       | ≤10                         | 11-15         | ≥16      |
| Rifampicine                   | 30µg               | ≤14                         | 14-16         | ≥19      |
| Chloramphenicol               | 30µg               | ≤12                         | 13-17         | ≥18      |
| Fosfomycine                   | 50µg               | <14                         | --            | >14      |

**Tableau 14** : valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour les Entérobactéries [99].

| Antibiotiques testés         | Charge des Disques | Diamètres critiques en (mm) |               |          |
|------------------------------|--------------------|-----------------------------|---------------|----------|
|                              |                    | Résistant                   | Intermédiaire | Sensible |
| <b>β-Lactamines</b>          |                    |                             |               |          |
| Ampicilline                  | 10µg               | ≤13                         | 14-16         | ≥17      |
| Amoxicilline+Ac clavulanique | 20/10µg            | ≤13                         | 14-17         | ≥18      |
| Cefazoline                   | 30µg               | ≤14                         | 15-17         | ≥18      |
| Céfoxitine                   | 30µg               | ≤14                         | 15-17         | ≥18      |
| Céfotaxime                   | 30µg               | ≤14                         | 15-22         | ≥23      |
| Imipeneme                    | 10µg               | ≤13                         | 14-15         | ≥16      |
| <b>Aminosides</b>            |                    |                             |               |          |
| Gentamicine                  | 10µg               | ≤12                         | 13-14         | ≥15      |
| Amikacine                    | 30µg               | ≤14                         | 15-16         | ≥17      |
| <b>Quinolones</b>            |                    |                             |               |          |
| Ofloxacine                   | 5µg                | ≤12                         | 13-15         | ≥16      |
| Ciprofloxacine               | 5µg                | ≤15                         | 16-20         | ≥21      |
| <b>Autres</b>                |                    |                             |               |          |
| Chloramphenicol              | 30µg               | ≤12                         | 13-17         | ≥18      |
| Furanes                      | 300µg              | ≤14                         | 15-16         | ≥17      |
| Fosfomycines                 | 50µg               | <14                         | --            | >14      |
| Trimethoprime/sulfamide      | 1,25/23,75µg       | ≤10                         | 11-15         | ≥16      |

## 11- PRODUCTION, PURIFICATION ET CARACTERISATION PARTIELLE DES ANTIBIOTIQUES :

### 11-1 Recherche de l'activité antibactérienne in vitro :

#### 11-1-1 sur milieu solide [100] [101] [102] :

##### -But :

Cette étape permet de mettre en évidence les zones d'activités antibactériennes des souches d'actinomycètes sur les bactéries cibles en milieu solide, afin de sélectionner les souches productrices d'antibiotiques.

##### -Technique [101] :

Le schéma 7 explique la technique de la recherche de l'activité antibactérienne sur milieu solide.

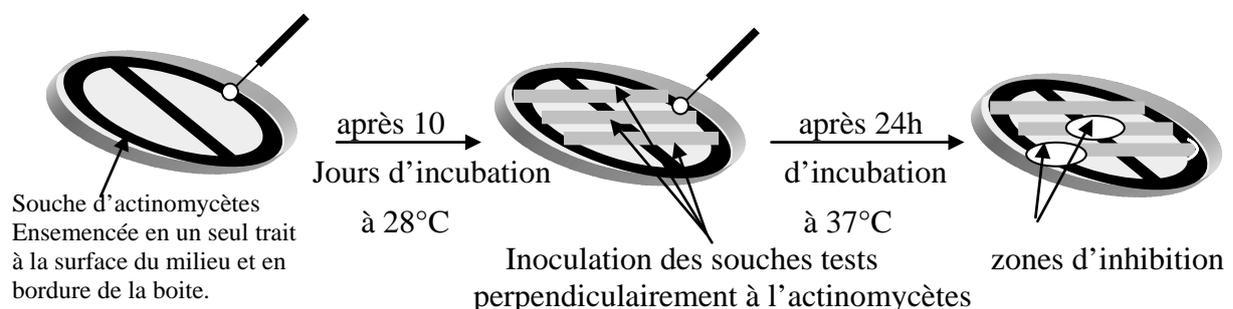
L'activité antibactérienne des souches isolées est évaluée par la méthode des stries croisées, en utilisant le milieu ISP n°2 [103] [104].

Cette technique consiste à ensemencer la souche d'actinomycète en un seul trait à la surface du milieu et en bordure d'une boîte de Pétri (diamètre = 90mm) [100] [104].

Après incubation à 28°C pendant 7 à 10 jours selon la croissance des isolats, les souches-tests de référence sont inoculées perpendiculairement à l'actinomycète [102].

Les souches-tests sont les suivantes :

- deux bactérie à Gram positif : *staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub>, *staphylococcus aureus* ATCC X<sub>2</sub> (MRSA).
- Deux bactéries à Gram négatif: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC Y, *Escherichia coli* ATCC Z.



**Schéma 7:** Technique de la mise en évidence de l'activité antibactérienne in vitro sur milieu solide.

### 11-1-2 Activité *in vitro* sur milieu liquide [100] [101]:

- Nous avons utilisé la méthode de diffusion sur gélose (papier buvards)
- le test d'activité antibactérienne est réalisé comme suit :

#### a- Repiquage des souches d'Actinomycètes sur milieu liquide :

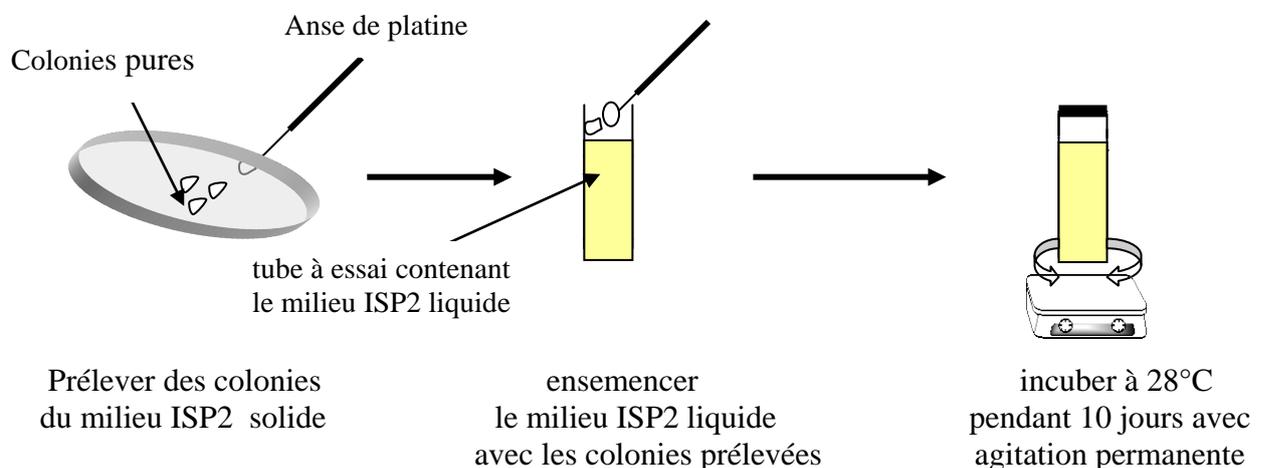
##### -But :

Cette étape permet aux souches d'actinomycètes de produire leurs métabolites secondaires durant la période d'incubation qui vont être récupérées à partir du surnageant après centrifugation du milieu de culture liquide [100] [101].

##### -Technique [100] [101] :

Le schéma 8 présente la technique de la mise en évidence de l'activité antibactérienne sur milieu liquide.

Les cultures pures des souches d'actinomycètes sont prélevées à partir d'un milieu solide puis ensemencées sur milieu ISP2 liquide en tube et incubées à 28°C pendant 10 jours sous agitation rotative permanente (180 tours/min) par l'utilisation d'un agitateur magnétique.



**Schéma 8** : Technique de la mise en évidence de l'activité antibactérienne *in vitro* sur milieu liquide.

#### b- Centrifugation [100]:

- centrifuger la culture obtenue dans le milieu ISP2 liquide à 5000 tours \ minute.
- récupérer le surnageant dans des tubes stériles.

**c- Préparation des bandelettes de papiers buvard [100] [101]:**

Le choix du papier buvard se fait par rapport à son épaisseur et à sa qualité d'absorption (après plusieurs essais).

- Découper le papier buvard sous forme de bandelettes (2cm×1cm).
- stériliser au four Pasteur à 190°C pendant 15min.

**d- Protocole du test d'activité antibactérienne sur milieu liquide [100] [101] :**

La figure 9 montre le protocole du test d'activité antibactérienne sur milieu liquide.

- Verser une quantité suffisante du surnageant de chaque souches d'Actinomycètes dans une boîte de Pétri stérile.
- Imprégner les bandelettes dans la boîte précédente.
- Laisser un temps de contact.
- Récupérer les bandelettes à l'aide d'une pince stérile ; mettez les dans une autre boîte de Pétri stérile.
- Sécher les bandelettes à l'étuve 37°C pendant 30 minutes.
- Stériliser les bandelettes sous UV (ultra violet) 254 nm pendant 20mn à une distance de 20cm [23].

**- Préparation du témoin [100] [101] :**

Nous avons procédé avec la même technique en remplaçant le surnageant avec l'eau distillée stérile.

**- Préparation de la suspension des souches de référence [100] [101] :**

- Prélever à l'aide d'une anse de platine stérile des colonies pures des souches cibles.
- Décharger le contenu de l'anse dans un tube à essai contenant 5 ml d'eau physiologique stérile.
- bien homogénéiser le contenu du tube au vortex.

**- Ensemencement des souches de références [100] [101] :**

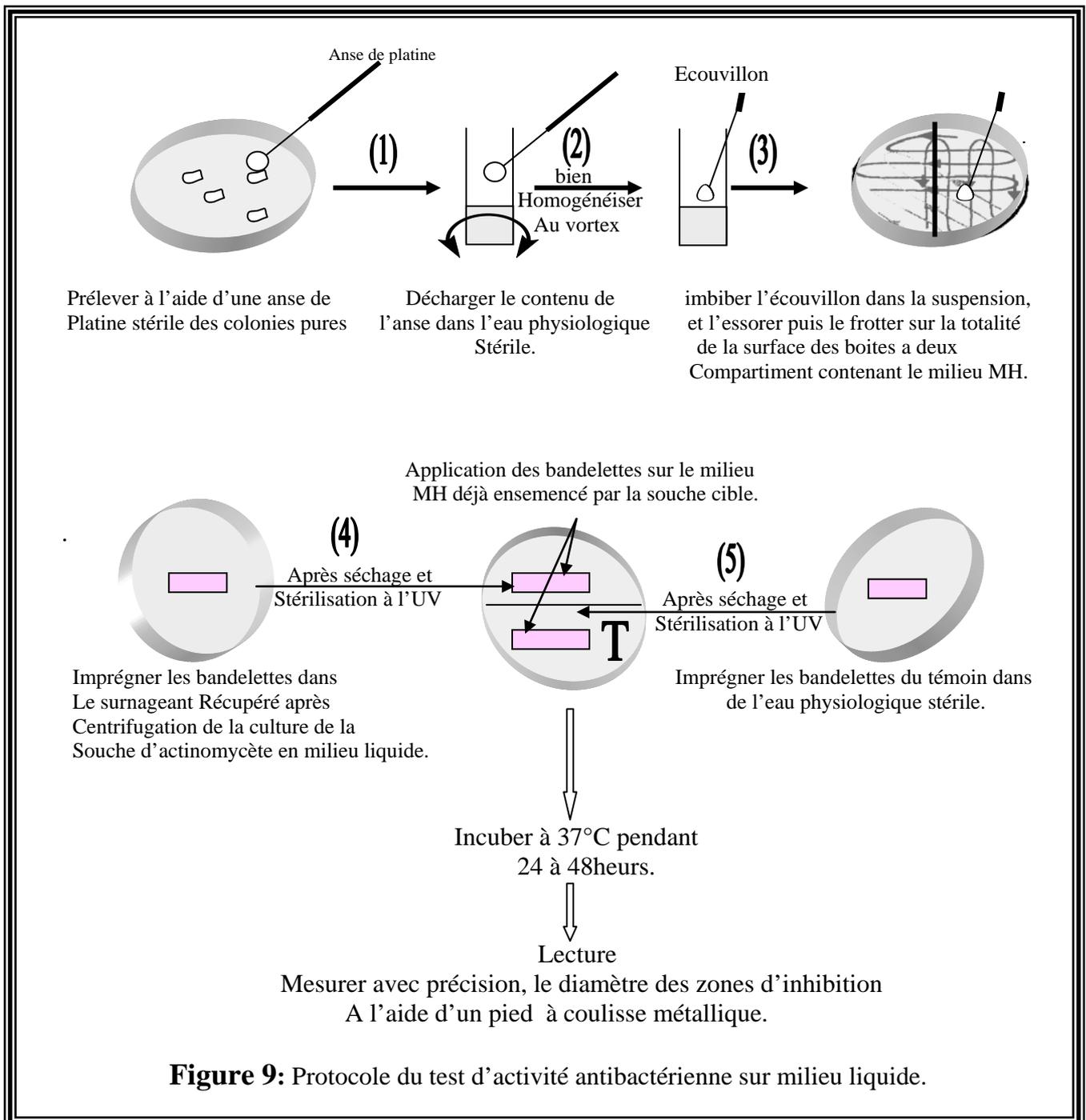
- Tremper un écouvillon stérile dans la suspension de la souche de référence cible déjà préparée.
- L'essorer en le pressant fermement (en le tournant) sur la paroi interne du tube afin de le décharger au maximum.
- frotter l'écouvillon sur la totalité de la surface gélosé (Milieu MH), sèche, de haut en bas et en stries serrées.

-répéter l'opération deux fois, en tournant la boîte de 60° à chaque fois sans oublier de faire pivoter l'écouvillon sur lui-même. Finir l'ensemencement en passant l'écouvillon sur la périphérie de la gélose.

**- Application des bandelettes [100] [101] :**

- presser dans un compartiment la bandelette du témoin et dans l'autre compartiment la bandelette du papier buvard imprégnée auparavant dans le surnageant des souches d'Actinomycètes, à l'aide d'une pince stérile pour s'assurer de son application, sans oublier de marquer le compartiment du témoin.

- les boîtes de pétri sont placées à 4°C pendant 2 heures puis incubées à 37°C.



**Figure 9:** Protocole du test d'activité antibactérienne sur milieu liquide.

### **11-2- Spectre d'activité des souches sélectionnées [100] [101] :**

L'objectif du criblage (screening) est de sélectionner des souches productrices d'antibiotiques les plus performantes provenant de différents échantillons du lac. Pour une étude plus approfondie concernant les molécules actives, particulièrement l'activité antibactérienne.

### **11-3- Production d'antibiotiques en milieu liquide [100] [101] :**

Les souches sélectionnées pour leur spectre d'action intéressant sont cultivées dans des Erlen Meyers de 500 ml à raison de 100ml du milieu de culture liquide, en faisant appel aux milieux l'ISP n° 1(Tryptone 5g, Extrait de levure 3g,eau distillée 1000ml ; pH ajusté à 7-7,2 ) [104] et l'ISP n°2[103]. Après inoculation avec 3ml d'une préculture de 3 à 5 jours en milieu liquide. Les cultures sont incubées en aérobiose à 28°C sous agitation rotative à 180 tours/mn[101].

La production d'antibiotiques est ainsi suivie quotidiennement à partir du 2ème jour. L'activité antibactérienne est testée sur les quatre souches de références, par l'utilisation de la méthode des puits. Chaque jour, 0.2ml de culture est déposé au fond des puits de 10mm de diamètre, réalisés dans le milieu ISP n°2 (contenant 12g/1 de gélose) précédemmentensemencé avec le germe cible et coulé en boîte de Pétri. Ces dernières sont mises à 4°C durant 2heures de manière à permettre la diffusion des molécules actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes. Après 24h à 48heurs d'incubation à 30°C nous mesurons les diamètres des zones d'inhibition. Parallèlement, l'évolution du pH est suivie durant toute la période de culture [103].

### **11-4- Extraction de l'activité antimicrobienne [101] [103] :**

La figure 9 montre le schéma général de l'extraction et de purification des antibiotiques.

Le suivi de la production de l'antibiotique en fonction du temps est effectué afin de déterminer la phase propice pour une meilleur production de l'antibiotique, nous procédons à l'extraction des molécules actives à la fois à partir du filtrat et du mycélium.

#### **11-4-1- Extraction à partir du filtrat [100] [104]:**

L'extraction de l'activité antibiotique à partir du filtrat nécessite le choix d'un solvant approprié qui doit de surcroît être non miscible avec l'eau. Nous avons ainsi testé quatre solvants de polarité différente: n-hexane, le dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol

[102] [103] [104]. Pour cela, 20ml de filtrat de culture sont extraits par le même volume (v/v) de solvant sous agitation pendant deux heures à température ambiante [104]. La phase organique est récupérée à l'aide d'une ampoule à décanter de 100ml, puis déshydratée après un passage à travers un filtre contenant du sulfate de sodium anhydre en poudre afin d'éliminer les contaminants hydrophiles. La phase déshydratée est évaporée à sec et sous vide à 45°C [104] [105] au rotavapor puis dissoute dans 0,5 ml de méthanol. Elle est ensuite testée par antibiographie de manière à savoir si l'extrait est actif ou non.

#### **11-4-2- Extraction à partir du mycélium [100] [104] :**

Le mycélium (environ 1g) est récupéré après filtration (filtre bactérien, 0.45µm de diamètre), lavé plusieurs fois avec de l'eau distillée, puis extrait avec 50 ml de méthanol pendant 2h sous agitation (agitateur magnétique) à température ambiante. L'extrait méthanolique est récupéré après filtration sur papier filtre puis déshydraté par passage dans du sulfate de sodium anhydre et enfin évaporé à sec au rotavapor à 40° C, ce dernier est dissout dans 0.5ml de méthanol avant de subir une antibiographie.

#### **11-5 Tests d'activité par antibiographie [101] :**

Les différents extraits organiques obtenus à partir du mycélium ou du filtrats, sont testés pour vérifier leurs activités antibactériennes. Pour cela nous avons utilisé la technique des disques de papier de 6mm de diamètre (Institut Pasteur de Paris) [103]. Celle-ci reçoivent chacun 50µl d'extrait et sont séchés à 37°C durant 30mn avant d'être stérilisés sous la lampe UV( 254nm) [100] . Les disques sont ensuite déposés à la surface d'une gélose molle d'ISP n° 2 (contenant 12g/l de gélose), déjàensemencé par les mêmes souches-tests que ceux utilisés lors des études sur les cénétiques de production. Des disques contenant des solvants purs, séchés et stérilisés de la même manière que ceux contenant les extraits, servent de témoins. Les boîtes de Pétri sont placées à 4°C pendant deux heures, puis incubées à 30°C. La mesure des zones d'inhibition autour des disques se fait après 24 à 48h.

#### **11-6 Chromatographie analytique sur couche mince: bioautographie [101] [105] :**

##### **11-6-1 Préparation des plaques de gel de silice [101] [105] :**

Les plaques de gel de silice sont préparées après mélange de 50g de gel de silice G60 (Merck) dans 100ml d'eau distillée dans un Erlen Meyer de 250 ml. Après une forte agitation durant 30 à 45 secondes, la pâte obtenue est immédiatement étalée, de manière uniforme sur des plaques en verre propres (20 x 20cm ou 10 x 20cm) à l'aide d'un étaloir de Dessaga réglé afin d'obtenir une couche fine de 0.25mm d'épaisseur. Les plaques sont ensuite séchées à

40°C pendant une nuit, puis utilisées immédiatement, sinon, dans le cas contraire, après activation par chauffage à l'étuve à une température de 105°C, juste avant l'emploi.

- les plaques nous ont été fournies par le laboratoire de chimie organique du département de chimie « Université Badji Mokhtar Annaba ».

### **11-6-2 Dépôt des échantillons et développement des plaques [101] [103] :**

Les échantillons sont déposés sur les plaques sous forme de spots par petites fractions, à l'aide d'une microsiringue. Les plaques sont ensuite placées dans une cuve de chromatographie dont l'atmosphère a été saturée durant 2h par la présence de 100ml de solvant de migration et du papier filtre tapissant les parois de la cuve.

Certains systèmes de solvant que nous avons employés sont très souvent utilisés pour l'étude des antibiotiques:

- BAE : n-butanol-acide acétique-eau (60 : 20 : 20; en volumes).
- AM: acétate d'éthyle- méthanol (100: 15 ; en volumes).
- éther de pétrole - dichlorométhane : (20, 80), (30, 70), (40, 60), (50, 50), (60, 40), (70, 30), (80, 20).

La chromatographie est arrêtée lorsque le front du solvant est distant de 1 à 2 cm du bord supérieur de la plaque. Celle-ci est ensuite placée à 37°C dans une étuve durant une nuit pour évaporer totalement le solvant. Les chromatogrammes sont ensuite observés sous lumière ultraviolette puis à la vapeur d'iode pour révéler les taches des produits séparés [104] [106].

### **11-7 Révélation microbiologique ou bioautographie (chromatographie sur colonne) [100] :**

Après la révélation des taches des produits sur les plaques CCM, et l'obtention de leur rapport frontale (RF), et avoir une idée sur leur polarité. Puis ils sont séparés et récupérés par chromatographie sur colonne à gel de silice (la technique est illustrée ci dessous). Chaque produit est testé seul sur les souches de référence précédentes (bioautographie) par la méthode des disques comme précédemment [101] [104].

$$RF = \frac{\text{Distance entre dépôt et tache}}{\text{Distance entre dépôt et front du solvant}}$$

### **11-7-1 Technique de la Chromatographie sur colonne [101] :**

#### **-Introduction :**

Cette technique de chromatographie solide liquide est préparative. Elle permet des séparations de quantité de substances qui peuvent varier de quelques mg à plusieurs grammes tout dépend du diamètre de la colonne et de la quantité d'adsorbant utilisés.

#### **-Principe :**

Dans un premier temps on remplit la colonne de la phase solide adsorbante (silice ou alumine) imprégnée d'un solvant, le niveau du liquide dans la colonne est abaissé au sommet de l'adsorbant.

L'échantillon à fractionner est dissous dans un minimum de solvant (celui qui est adéquat) on le dépose au sommet de la colonne pour subir l'élution. Les constituants sont entraînés vers le bas à des vitesses différentes.

Préparer la colonne, imprégner la silice par le solvant d'élution et verser le mélange dans la colonne. Lorsque la silice se dépose et que le solvant surnage, ajuster la hauteur du solvant à 0,5 cm de la tête de silice. Ensuite introduire à l'aide d'une pipette, et sur les parois l'échantillon à séparer solubilisé dans le solvant adéquat. Le mélange à séparer est ensuite introduit en tête de colonne.

#### **-Elution:**

Ajouter progressivement l'éluant adéquat, en veillant à ce que la colonne ne reste jamais à sec. L'éluant fait migrer différentes zones le long de la colonne, les produits séparés sont récupérés dans des tubes à essais, la vérification de leur pureté se fait par chromatographie sur couche mince en vue de réunir le contenu des tubes renfermant le même produits séparé.

Les produits séparés sont débarrassés du solvant par évaporation au rotavapor pour éliminer toute trace de solvant en vue de les peser et avoir une idée sur leurs poids, puis ils sont dissous et récupérés dans un volume de solvant bien défini (selon l'objectif du travail).

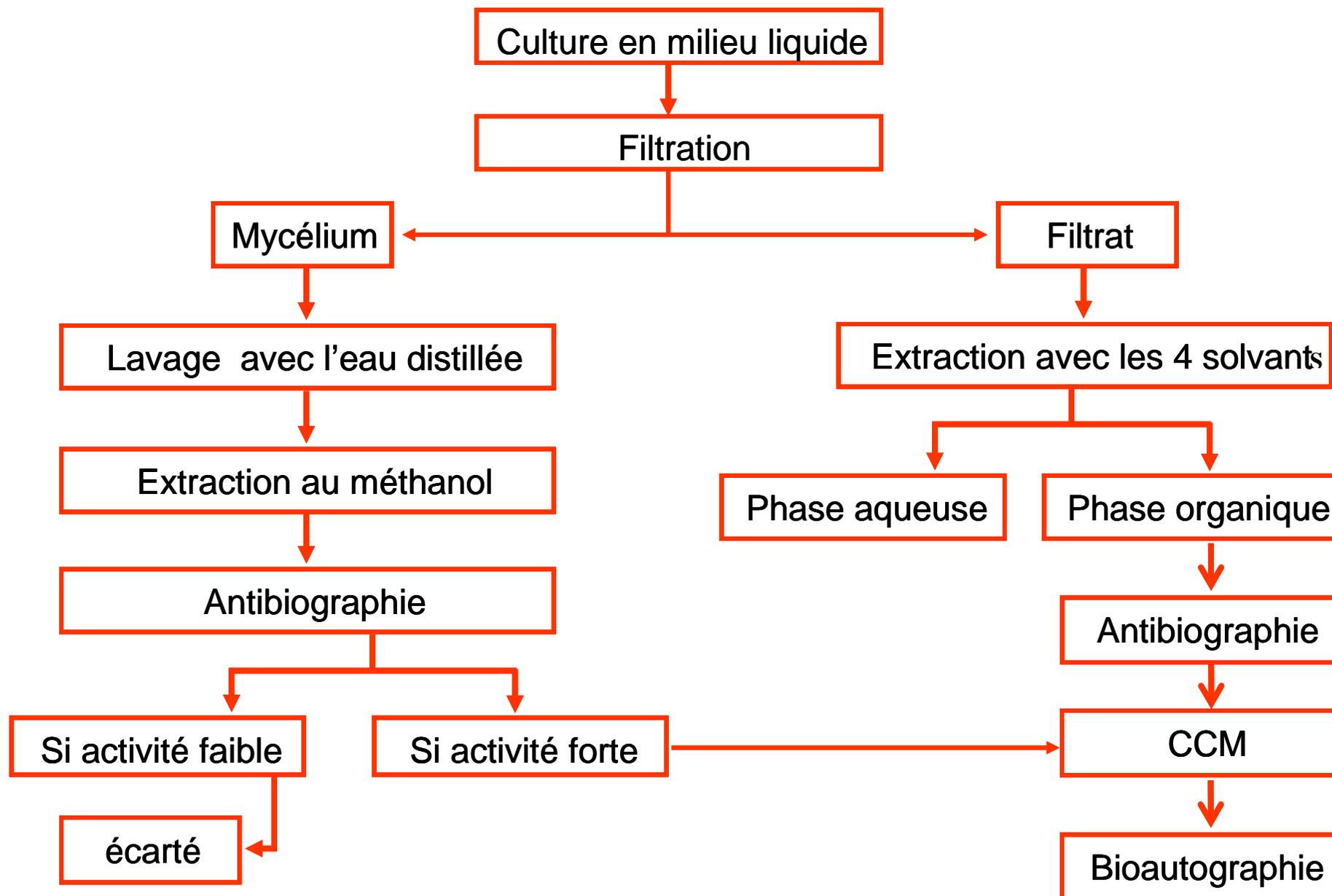


Figure 10 : Schéma général de la production, de l'extraction et de la purification des antibiotiques



RESULTATS  
ET  
DISCUSSION

## 1- ANALYSES DES ECHANTILLONS MERES :

### 1-1 Analyses physico-chimiques :

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons mères sont représentés dans le tableau 15.

#### 1-1-1- Mesure du pH :

- EM1= 7,8
  - EM2= 7,8
  - EM3= 7,5
  - EM4= 7,8
- } 1<sup>ier</sup> site du prélèvement (Nord).  
 2<sup>eme</sup> site du prélèvement (Centre).  
 3<sup>eme</sup> site du prélèvement (Sud).

Le pH des 3 sites de prélèvement est proche de la neutralité et tend légèrement vers l'alcalinité. Ce qui n'empêche pas la prolifération des Actinomycètes (REED RODRIGUES COELHO.R et al., 1978) [13], (LECHEVALIER M.P., 1981) [14].

Il est compris entre les deux valeurs limites du pH de l'eau (6,8- 8) En dessous de ce seuil, l'eau est dite « agressive ». Avec un pH supérieur à 8, l'eau est trop alcaline [5].

- Malgré les déversements des rejets urbains auxquels elle est exposée, l'eau du lac a un pH proche de la neutralité.

#### 1-1-2- Mesure de la température :

Il est important de mesurer la température de l'eau avec une bonne précision parce qu'elle joue un rôle dans la solubilité des sels et des gaz et dans la dissociation des sels dissous ce qui influe sur sa conductivité électrique et dans la détermination de son pH. Ceci pour connaître la température à laquelle vivent les microorganismes isolés à partir de cette eau [7].

La température des eaux superficielles est influencée par celle de l'air d'où la nécessité de la détermination de cette dernière [7].

1-1-3-1- Température de l'air : 18°C.

1-1-3-2- Température de l'eau des échantillons mères :

- EM1 = 12°C.
- EM2 = 12°C.
- EM3 = 12°C.
- EM4 = 11°C.

La température de l'eau du lac est basse (mois de Décembre).

**1-1-3- Mesure de la conductivité électrique (CE) :**

La mesure de la conductivité électrique permet d'évaluer rapidement mais approximativement la minéralisation globale de l'eau (quantité de sels dans l'eau) [1] [7], et se fait de préférence à la température de référence 25°C. La température de l'eau du lac étant basse, nous avons procédé à la correction en fonction de la température selon l'équation suivante :

$$C_{25^{\circ}\text{C}} = C_T \times F [7].$$

**C<sub>T</sub>** : la conductivité obtenue à la température lue sur le thermomètre de terrain.

**F** : Facteur de correction [7].

- EM1= 552 μS/cm.
- EM2= 552μS/cm.
- EM3= 582 μS/cm.
- EM4= 578 μS/cm.

La conductivité électrique des 3 sites de prélèvement est entre 552 et 582 μS/cm avec une moyenne de 570 μS/cm, elle est incluse dans l'intervalle de la conductivité des eaux de minéralisation moyenne (entre 333 et 833 μS/cm) [7].

**Tableau 15** : paramètres physicochimique des échantillons mères

| Echantillons<br>Mères<br>Paramètres<br>physicochimiques | EM1         | EM2        | EM3        | EM4        |
|---|-------------|------------|------------|------------|
| pH  | <b>7.8</b>  | <b>7.8</b> | <b>7.5</b> | <b>7.8</b> |
| Température (°C)  | <b>12</b>   | <b>12</b>  | <b>12</b>  | <b>11</b>  |
| Conductivité (μS/cm)                                    | <b>552</b>  | <b>552</b> | <b>582</b> | <b>578</b> |
| Température de l'air                                    | <b>18°C</b> |            |            |            |

Après 28 jours d'incubation nous avons effectué des observations macroscopiques des différentes cultures qui ont poussées sur les milieux de cultures utilisés. Les colonies suspectes répondant aux caractères morphologiques des Actinomycètes sont résumées dans le tableau 16.

## 2-Observation Macroscopique des Colonies Suspectes :

**Tableau 16 :** Aspect macroscopique des colonies suspectes (T°C : 28°C).

| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures           | Aspect Macroscopique  |                                 |
|--------------|----|------------------|-------------------------------|---|---------------------------------|
|              |    |                  |                               | Aspect de la colonie (Recto)  | Couleur du Mycélium de substrat |
| 18           | 01 | 10 <sup>-3</sup> | Pomme de terre- carotte- Agar | - Taille : Φ = 5mm<br>-Couleur : gris blanc<br>-contour irrégulier<br>-sèche<br>-incrustée dans la gélose   | Jaune diffusible dans la gélose |
| 01           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Dextrose- Tryptose-Agar       | - Taille : Φ= 3 -5 mm<br>-Couleur : blanc plâtre,<br>- contour régulier<br>-ridée, sèche<br>-incrustée dans la gélose   | couleur marron                  |
| 02           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Gousse                        | - taille : Φ= 6 mm<br>- Couleur : blanc gris<br>- Contour régulier<br>- Sèche<br>- bombée<br>- Présence de gouttelette d' exudation<br>- incrustée dans la gélose | Jaune avec centre claire        |
| 03           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Gousse                        | - taille : Φ=2 mm<br>- couleur : blanc gris<br>- ronde<br>- contour régulier<br>- incrustée dans la gélose  | marron                          |
| 06           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Gousse                        | - taille Φ = 3-5 mm<br>- couleur blanc gris<br>- sèche<br>- contour régulier<br>- incrustée dans la gélose  | Marron                          |
| 08           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | ISP3                          | - taille Φ = 4 mm<br>- couleur : blanc plâtre<br>- contour régulier<br>- bombée<br>- granuleuse<br>- incrustée dans la gélose                                     | Rose                            |

-suite du Tableau 16 :

| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures  | Aspect Macroscopique   |                                 |
|--------------|----|------------------|----------------------|--|---------------------------------|
|              |    |                  |                      | Aspect de la colonie (Recto)   | Couleur du Mycélium de substrat |
| 13           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | ISP3                 | - taille $\Phi$ =4mm<br>- couleur : blanc plâtre<br>- bombée<br>- sèche et ridée<br>- incrustée dans la gélose               | Jaune                           |
| 15           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Asparagine glucose   | - taille $\Phi$ = 5mm<br>- couleur : jaune<br>- ronde<br>- incrustée dans la gélose  | Jaune                           |
| 16           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Milieu de Lindenbein | - taille $\Phi$ = 2-3mm<br>- couleur : gris blanc<br>- contour irrégulier<br>- granuleuse<br>- incrustée dans la gélose      | Rose                            |
| 33           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Czapek SC            | - taille $\Phi$ = 3mm<br>- gris<br>- granuleuse<br>- contour irrégulier<br>- incrustée dans la gélose                        | Jaune marron                    |
| 17           | 02 | 10 <sup>-2</sup> | DTA                  | - taille $\Phi$ = 4mm<br>- couleur : gris blanc<br>- contour irrégulier<br>- bombée<br>- incrustée dans la gélose            | Jaune centre marron             |
| 28           | 02 | 10 <sup>-2</sup> | GN                   | -taille $\Phi$ = 2mm<br>- couleur : gris<br>-rugueuse<br>-sèche<br>-contour régulier<br>-bombée<br>-incrustée dans la gélose | Marron                          |
| 24           | 02 | 10 <sup>-3</sup> | Gausse               | - taille $\Phi$ = 20mm<br>- couleur : gris blanc<br>- contour régulier<br>- bombée<br>- sèche<br>- incrustée dans la gélose  | Jaune                           |
| 25           | 02 | 10 <sup>-3</sup> | Gausse               | - taille $\Phi$ = 6 mm<br>- couleur : gris<br>- centre claire<br>- sèche<br>- rugueuse<br>- incrustée dans la gélose         | Jaune                           |

**-suite du Tableau 16 :**

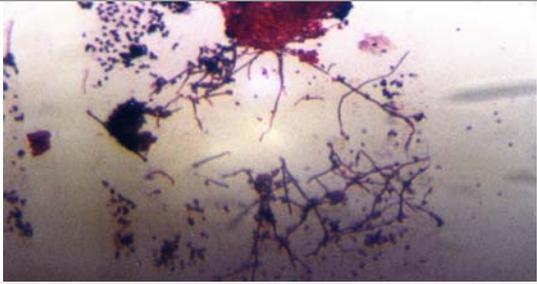
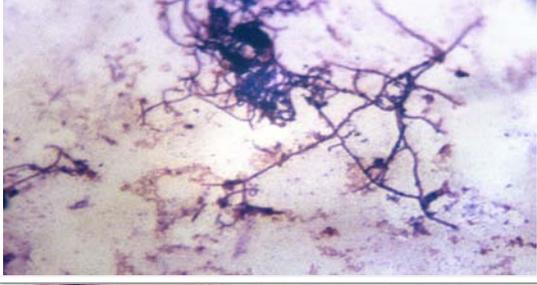
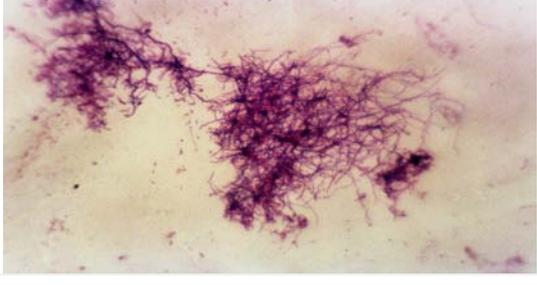
| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures | Aspect Macroscopique  |                                  |
|--------------|----|------------------|---------------------|---|----------------------------------|
|              |    |                  |                     | Aspect de la colonie (Recto)  | Couleur du Mycélium de substrat  |
| 35           | 02 | 10 <sup>-4</sup> | Gausse              | - taille $\Phi = 4\text{mm}$<br>- couleur : gris<br>- forme de rose<br>- bombée avec centre noir<br>- Incrustée dans la gélose                        | marron                           |
| 10           | 03 | 10 <sup>-2</sup> | Czapek SC           | - taille : $\Phi = 4\text{ mm}$<br>- couleur : blanc plâtre<br>- contour irrégulier<br>- sèche<br>- incrustée dans la gélose                          | Marron diffusible dans la gélose |
| 12           | 3  | 10 <sup>-2</sup> | OGYA                | - taille $\Phi = 7\text{mm}$<br>- couleur : blanc<br>- bombée<br>- contour régulier<br>- incrustée dans la gélose                                     | Jaune                            |
| 05           | 03 | 10 <sup>-3</sup> | GN                  | - Taille : $\Phi = 1-2\text{ mm}$<br>- Couleur : blanc plâtre<br>- Forme en rosette<br>- Contour irrégulier<br>- Bombée<br>- incrustée dans la gélose | Jaune marron                     |
| 09           | 03 | 10 <sup>-3</sup> | Gausse              | - taille : $\Phi = 3\text{ mm}$<br>- stratifiée blanc rouge brique<br>- colonie plate<br>- contour régulier<br>- incrustée dans la gélose             | Noire                            |
| 11           | 04 | 10 <sup>-3</sup> | ISP3                | -taille $\Phi = 3\text{mm}$<br>-couleur : Blanc<br>-Contour régulier<br>-incrustée dans la gélose   | Jaune                            |
| 27           | 04 | 10 <sup>-3</sup> | Czapek              | - taille $\Phi = 4\text{ mm}$<br>- couleur : bleu vert<br>- contour régulier<br>- sèche<br>- centre claire<br>- incrustée dans la gélose              | Jaune                            |
| 23           | 04 | 10 <sup>-5</sup> | Czapek              | - taille $\Phi = 3\text{mm}$<br>- couleur : blanc<br>- contour régulier<br>- bombée<br>- incrustée dans la gélose                                     | Marron                           |

- Chaque colonie suspecte est observée au microscope optique G×100 pour confirmer son appartenance aux actinomycètes (caractères micromorphologiques) puis repiquée sur le milieu ISP2 en vue de la purifier. L'examen microscopique des colonies suspectes est présenté dans le tableau 17.

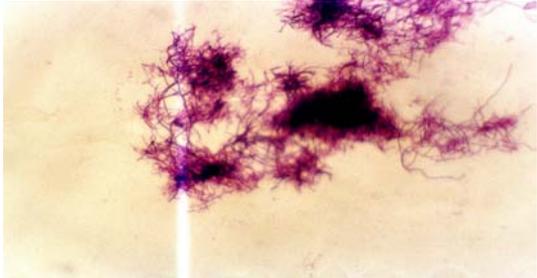
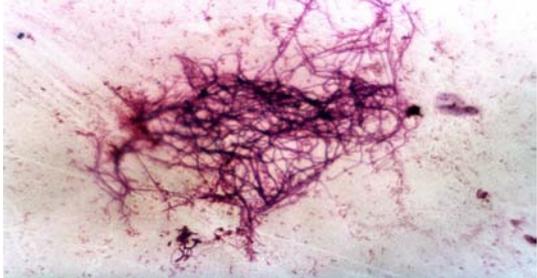
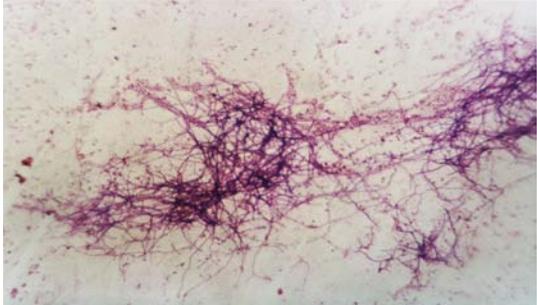
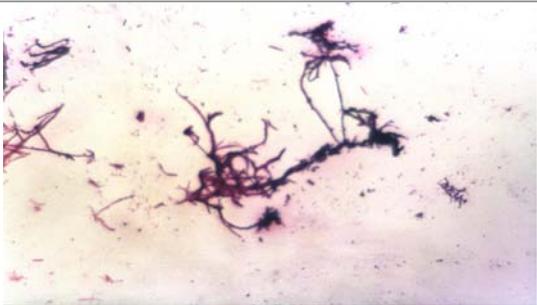
- Nous avons utilisé le milieu de culture ISP2 pour purifier les souches d'actinomycètes parce qu'il s'est révélé meilleur que certains autres selon les résultats de (BOUDJELLA H., 1994) [107] et (SLAVICA B., 2005) [108] et permet une bonne croissance des souches.

### 3- Observation Microscopique Des Colonies Suspectes :

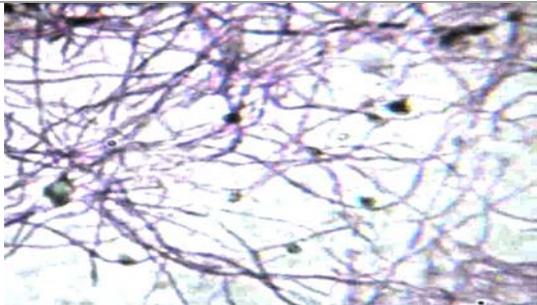
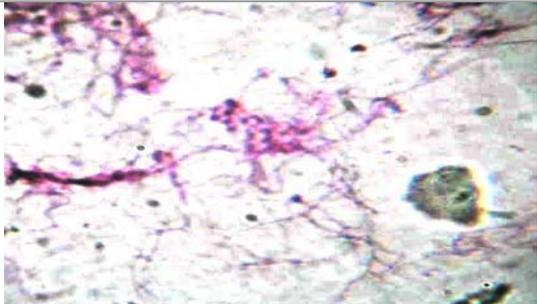
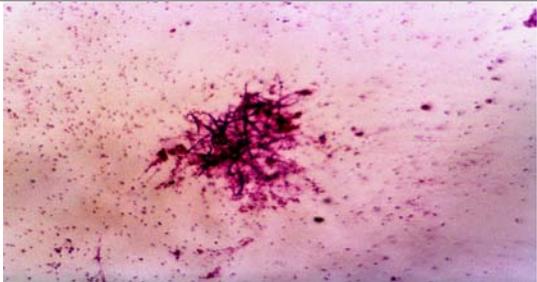
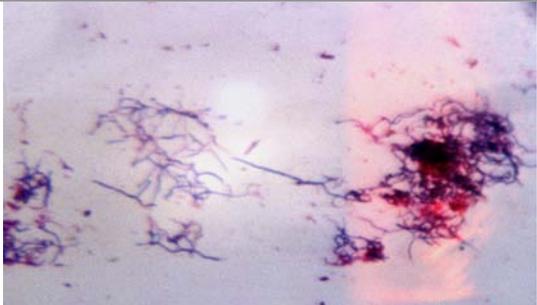
**Tableau 17** : Aspect microscopique des colonies suspectes.

| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures         | aspects microscopiques (G × 100)   |
|--------------|----|------------------|-----------------------------|--|
| 18           | 01 | 10 <sup>-3</sup> | Pomme de terre-carotte-Agar |    |
| 01           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Dextrose-Tryptose-Agar      |   |
| 02           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Gousse                      |  |
| 03           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Gousse                      |  |
| 06           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Gousse                      |  |

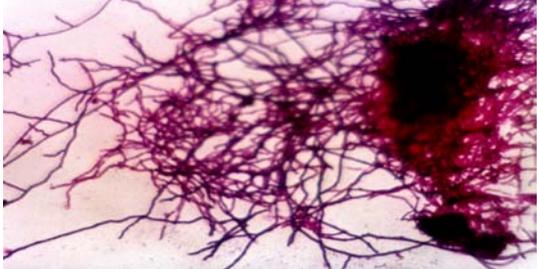
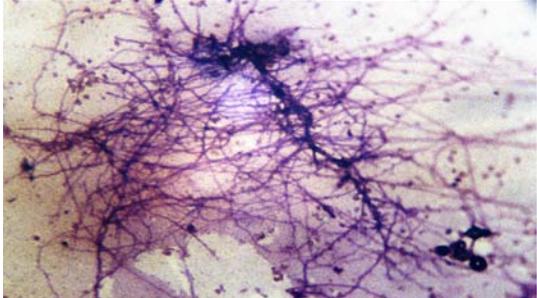
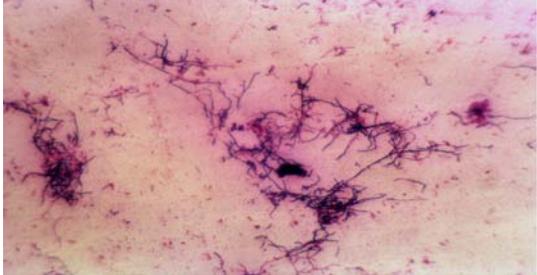
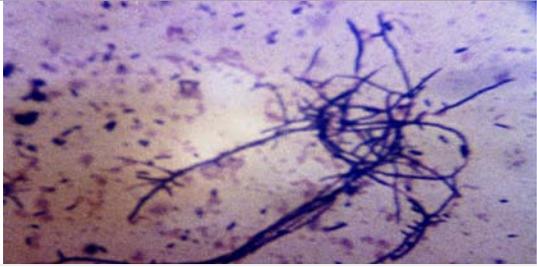
-Suite du tableau 17 :

| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures | aspects microscopiques (G × 100)   |
|--------------|----|------------------|---------------------|--|
| 08           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | ISP3                |    |
| 13           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | ISP3                |   |
| 15           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Asparagine glucose  |  |
| 16           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | SYA                 |  |
| 33           | 02 | 10 <sup>-1</sup> | Czapek DC           |  |

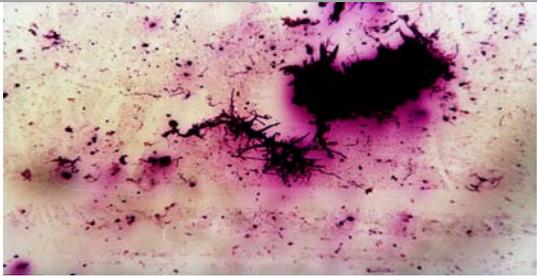
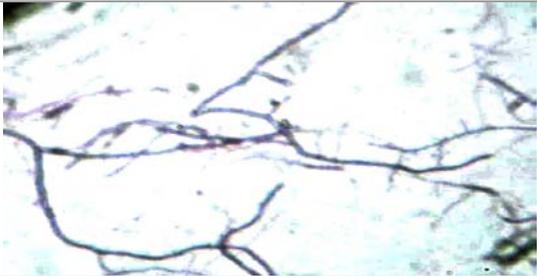
-Suite du tableau 17 :

| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures              | aspects microscopiques (G × 100)   |
|--------------|----|------------------|----------------------------------|--|
| 17           | 02 | 10 <sup>-2</sup> | Dextrose –<br>Tryptose -<br>Agar |    |
| 28           | 02 | 10 <sup>-2</sup> | GN                               |    |
| 24           | 02 | 10 <sup>-3</sup> | Gausse                           |  |
| 25           | 02 | 10 <sup>-3</sup> | Gausse                           |  |
| 35           | 02 | 10 <sup>-4</sup> | Gausse                           |  |

-Suite du tableau 17 :

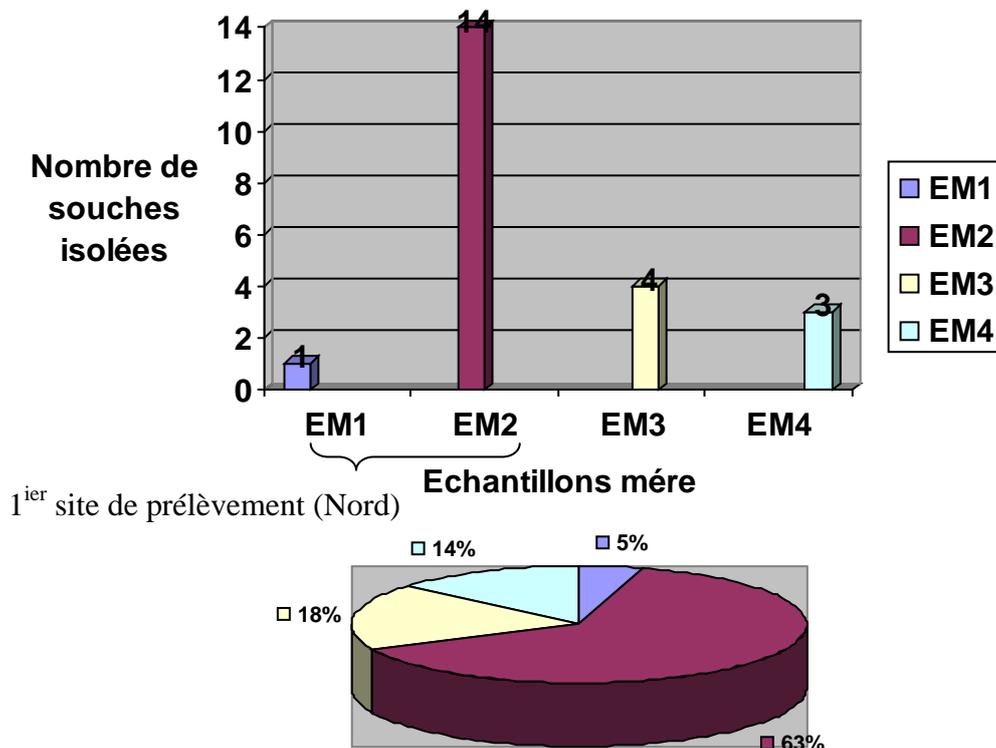
| N° de souche | EM | Dilution  | Milieux de cultures         | aspects microscopiques (G × 100)   |
|--------------|----|-----------|-----------------------------|--|
| 10           | 03 | $10^{-2}$ | Czapek double concentration |    |
| 12           | 03 | $10^{-2}$ | OGA                         |    |
| 05           | 03 | $10^{-3}$ | GN                          |   |
| 09           | 03 | $10^{-3}$ | Gausse                      |  |
| 11           | 04 | $10^{-3}$ | ISP3                        |  |

**-Suite du tableau 17 :**

| N° de souche | EM | Dilution         | Milieux de cultures | aspects microscopiques (G × 100)   |
|--------------|----|------------------|---------------------|--|
| 27           | 04 | 10 <sup>-3</sup> | Czapek SC           |  |
| 23           | 04 | 10 <sup>-5</sup> | Czapek SC           |  |

- **Remarque :** Les photos des cultures sélectionnées ainsi que celles de leur examen microscopique sont présentées sur des planches dans la partie Annexe.

-Les résultats obtenus après l’observation macroscopique et microscopique des colonies suspectes en vue de sélectionner les souches d’actinomycètes sont présentés dans les figures 11 et 12.



**Figure11 :** Nombre de souches isolées à partir de chaque échantillon mère.

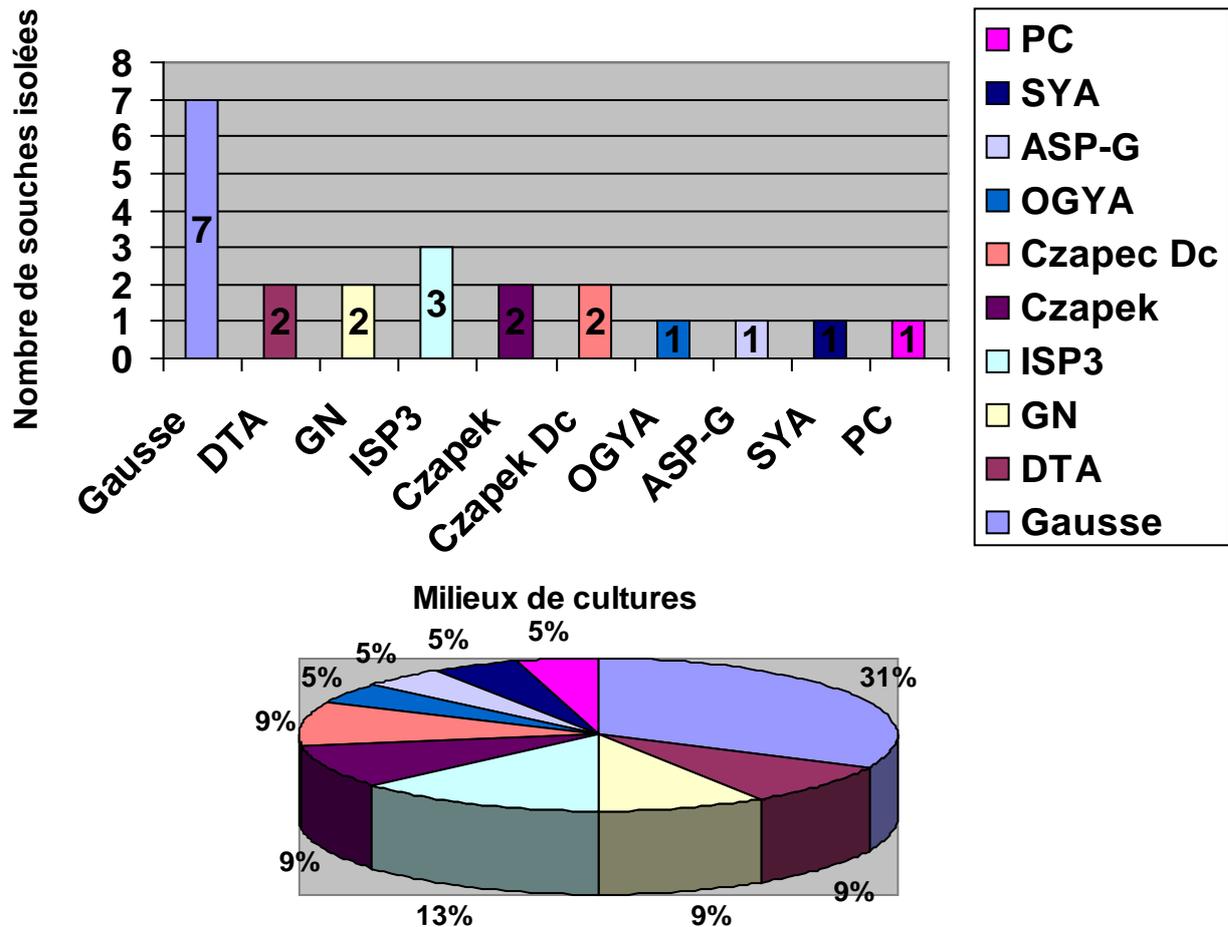
L'analyse des résultats obtenus nous permet de mieux connaître la richesse des différents sites de prélèvement en actinomycètes.

Parmi les 22 souches sélectionnées sur les différents milieux utilisés, 15 proviennent du 1<sup>ier</sup> site de prélèvement, dont 14 à partir du EM2 qui est traité à la chaleur (50°C pendant 10mn) et qui sont souches thermotolérantes : Souches :(1,2,3,6,8,13,15,16,17,24,25,28,33,35). Une seule souche, la S18 provient de l'échantillon EM1.

- 4 souches ont été isolées à partir du 2<sup>eme</sup> site (EM3 Sud) : Souches : 5, 9, 10 et 12.
- 3 souches ont été isolées à partir du 3<sup>eme</sup> site (EM4 Sud) : Souches : 11, 23 et 27.

Il est bien clair que 68% des souches sélectionnées sur les différents milieux utilisés proviennent du 1<sup>ier</sup> site du prélèvement. Ceci est dû aux différents facteurs auxquels ce site est exposé. Le premier site de prélèvement est situé au Nord du lac près de l'agglomération et subit donc des déversements d'eaux usées urbaines ce qui fait de cette partie du lac un milieu de culture favorable au développement des microorganismes. En s'éloignant du premier site de prélèvement vers le centre et le sud du lac la matière organique diminue et ceci joue sur la charge microbienne. Ce qui explique la faible charge microbienne des deux autres sites de prélèvement (centre et sud).

Les souches d'actinomycètes sélectionnées sont isolées sur les milieux de culture présentés dans la figure 12



**Figure 12** : Nombre de souches isolées sur chaque milieu de culture

L'histogramme présenté dans la figure 15 montre que la majorité des souches d'Actinomycètes sélectionnées sont isolées sur le milieu de culture Gausse : souches : 2, 3, 6, 9, 24, 25 et 35.

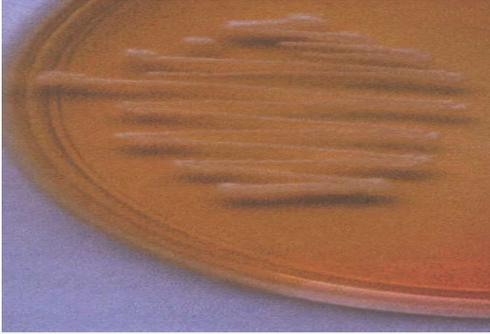
Le milieu de culture Gausse est composé d'une seule source de carbone qui est l'amidon qui permet en présence d'une source de nitrogène minérale ( $\text{KHNO}_3$ ) avec des traces d'oligoélément (Magnésium sous forme de  $\text{MgSO}_4$  et le Potassium sous forme de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) une très bonne croissance aux souches d'actinomycètes et augmente la probabilité d'isoler ces souches selon les résultats de (MELLOULI L. et al .,2003)[106].

#### 4-OBSERVATION MACROSCOPIQUE DES SOUCHES DE

#### REFERENCE :

Les résultats de l'observation macroscopique des souches de références testées sont présentés dans le tableau 18.

**Tableau 18** : Aspect macroscopique des souches de références cible utilisées.

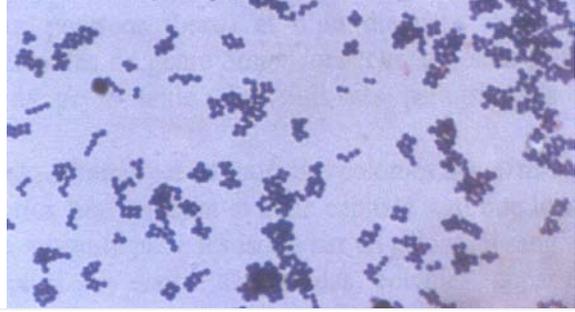
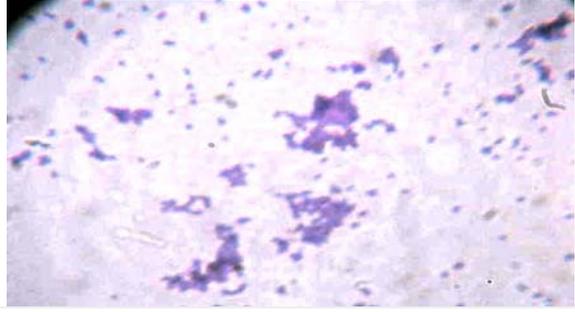
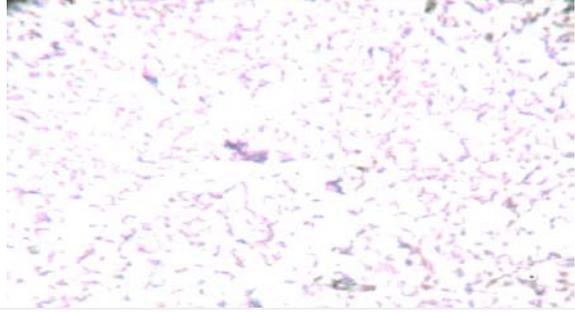
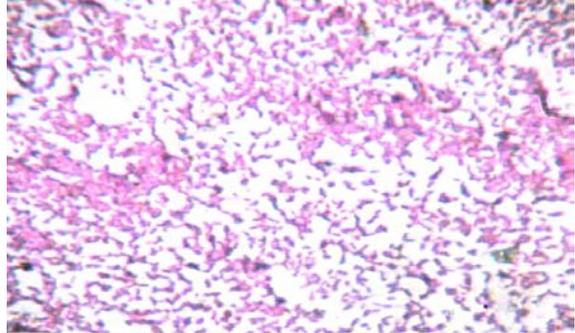
| observations<br>souches de<br>références cibles            | Observation macroscopique  | Notes   |
|--|--|---|
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC X <sub>1</sub> (MRSA) |   | - colonies luxuriantes entourées d'une auréole jaune due à la fermentation du manitol |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC X <sub>2</sub>        |  |   |
| <i>Pseudomonace aeruginosa</i><br>ATCC Y                   |  | - colonies de taille moyenne bombées muqueuses, contour régulier                      |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC Z                          |  | - Colonies de taille moyenne, contour régulier, lisse, bombées de couleur beige.      |

## 5- OBSERVATION MICROSCOPIQUE DES SOUCHES DE

### REFERENCE :

Les résultats de l'observation microscopique (G×100) des souches de références testées sont présentés dans le tableau 19.

**Tableau 19:** Aspect microscopique des souches de référence cible utilisées.

| observations<br>souches de<br>références cibles            | Observation microscopique<br>(G×100)   | Notes  |
|--|--|--|
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC X <sub>1</sub> (MRSA) |    | - Cocci Gram positif regroupés en grappes de raisins.      |
| <i>Staphylococcus aureus</i><br>ATCC X <sub>2</sub>        |   | - Cocci Gram positif regroupés en grappes de raisins.      |
| <i>Pseudomonace aeruginosa</i><br>ATCC Y                   |  | - Des bâtonnets très fins Gram négatif                     |
| <i>Escherichia coli</i><br>ATCC Z                          |  | - Des bâtonnets Gram négatif de longueur et diamètre moyen |

- Les résultats de l'observation macroscopique et microscopique des souches de référence utilisées confirment leur pureté.

## 6- ETUDE DES CARACTERES BIOCHIMIQUES DES SOUCHES DE REFERENCE CIBLE :

### 6.1 -*Escherichia coli* Z ATCC :

- Les résultats de l'étude des caractères biochimiques de la souche de référence Z ATCC Répondent réellement au profil numérique spécifique à l'espèce : *Escherichia coli*.

- les caractères biochimiques de la souche de référence *Escherichia coli* Z ATCC sont présentés dans la fiche des résultats du système API20E figure 13.

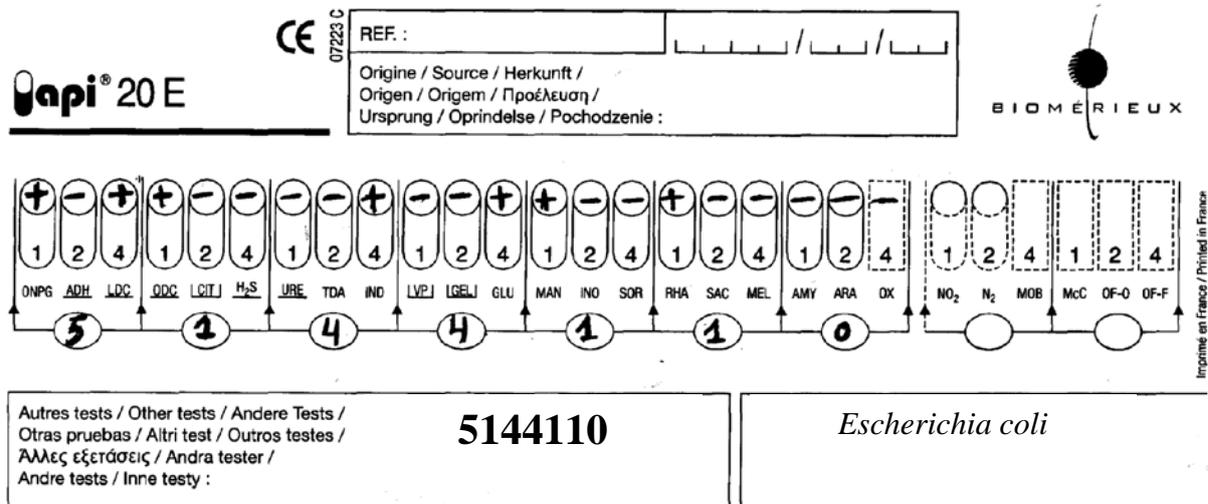


Figure 13 : Fiche des résultats de l'API 20E de la souche de référence Z ATCC.

### 6.2 -*Staphylococcus aureus* X1 ATCC (MRSA) :

- Le résultat du test de la Catalase de la souche de référence X<sub>1</sub> ATCC est positif par le dégagement de bulles gazeuses (Catalase +).

- Les résultats de l'étude des caractères biochimiques de la souche de référence X<sub>1</sub> ATCC répondent réellement au profil numérique spécifique à l'espèce *Staphylococcus aureus*.

- les caractères biochimiques de la souche de référence *Staphylococcus aureus* X<sub>1</sub> ATCC sont présentés sur la fiche des résultats du système API20E figure 14.

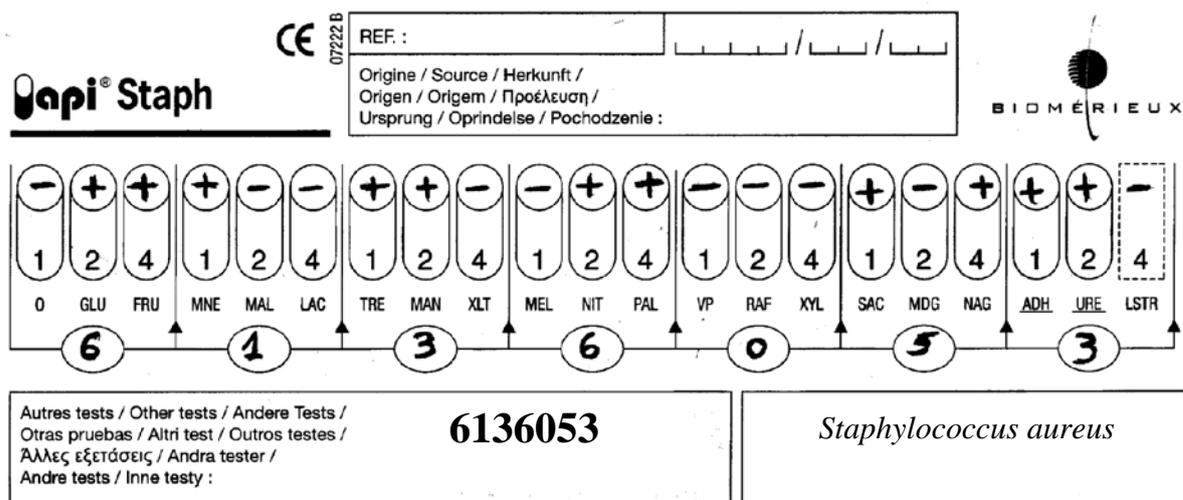


Figure 14 : Fiche de résultats du système API Staph de la souche de référence X<sub>1</sub>(MRSA)

### 6.2 -*Staphylococcus aureus* X<sub>2</sub> ATCC:

- Le résultat du test de la Catalase de la souche de référence X<sub>2</sub> ATCC est positif par le dégagement de bulles gazeuses (Catalase +).
- Les résultats de l'étude des caractères biochimiques de la souche de référence X<sub>2</sub> ATCC répondent réellement au profil numérique spécifique à l'espèce *Staphylococcus aureus*.
- les caractères biochimiques de la souche de référence *Staphylococcus aureus* X<sub>2</sub> ATCC sont présentés sur la fiche des résultats du système API20E figure 15.

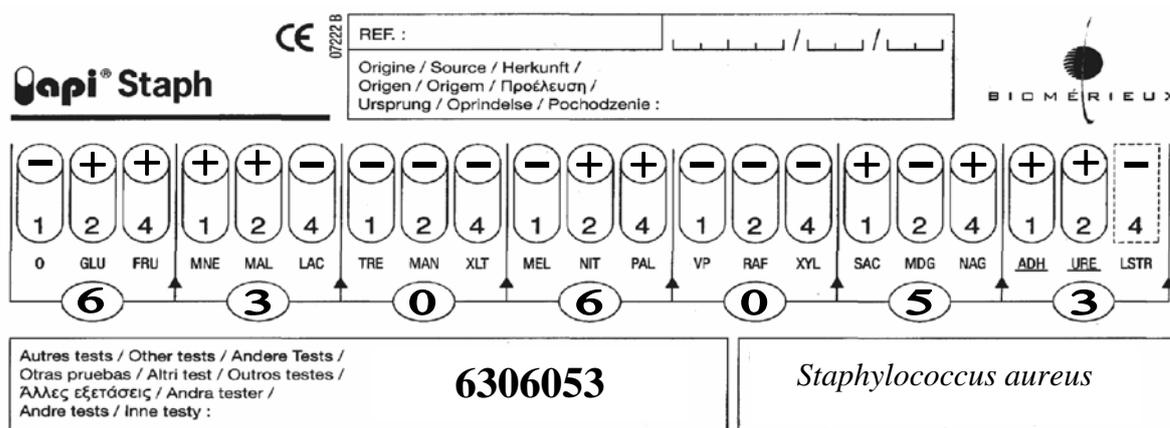


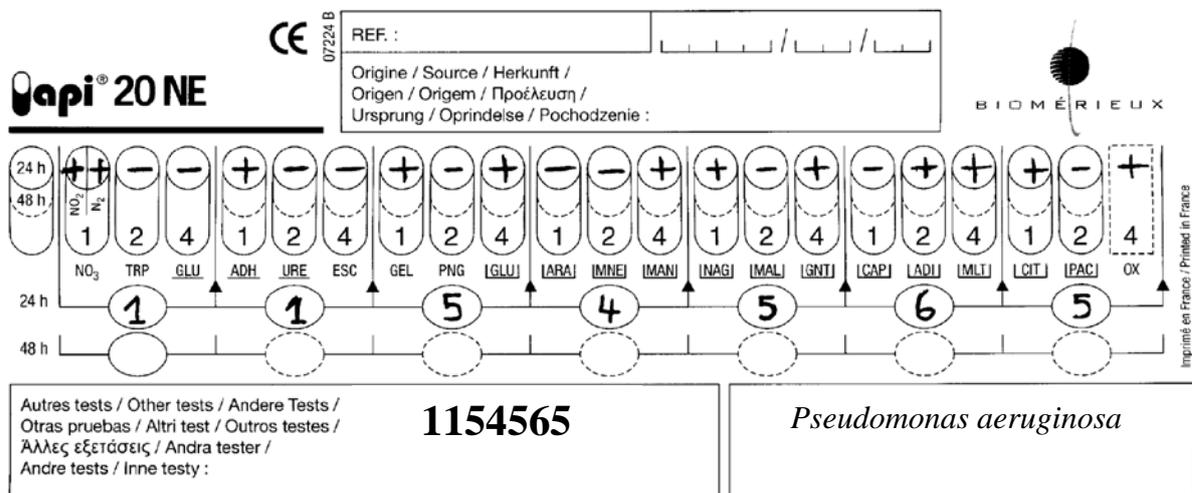
Figure 15: Fiche de résultats du système API Staph de la souche de référence X<sub>2</sub>.

**6.3-Pseudomonas aeruginosa Y ATCC :**

- le test de l'oxydase de la souche de référence Y est positif par l'apparition d'une Coloration violette foncée.

- Les résultats de l'étude des caractères biochimiques de la souche de référence Y ATCC répondent réellement au profil numérique spécifique à l'espèce *Pseudomonas aeruginosa*

- les caractères biochimiques de la souche de référence *Pseudomonas aeruginosa* Y ATCC sont présentés sur la fiche des résultats du système API20NE figure 16.



**Figure 16 :** Fiche des résultats du système API 20NE de la souche de référence Y

**7- ANTIBIOGRAMME DES SOUCHES DE REFERENCE CIBLES :**

Les résultats de l'antibiogramme des deux souches de références *S.aureus* X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub> sont présentés dans la figure 19.

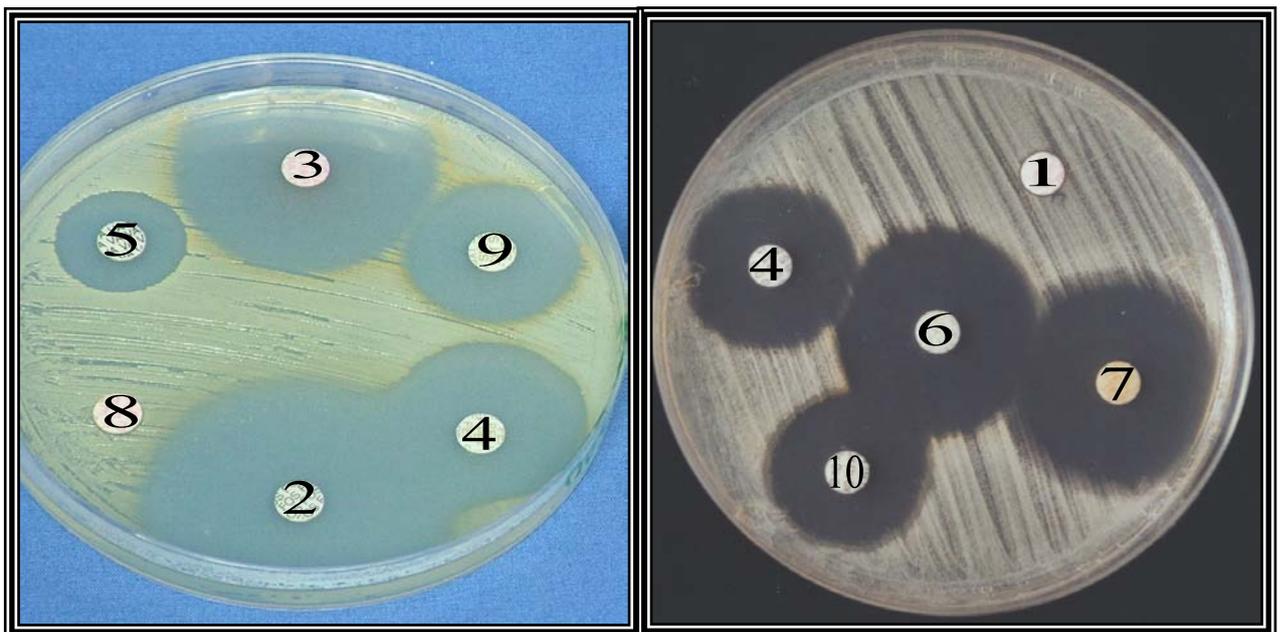
**7.1-Staphylococcus aureus X<sub>1</sub> ATCC (MRSA) :**

Les résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible X<sub>1</sub> sont présentés dans le tableau 20.

La figure17 représente l'antibiogramme de la souche de référence cible X<sub>1</sub>.

**Tableau 20** : Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible X<sub>1</sub>.

| N°= | Dénominations communes     | Signe | Charge du disque | Diamètre en mm | résultat |
|-----|----------------------------|-------|------------------|----------------|----------|
| 01  | Clindamycine               | CM    | 2 µg             | 0              | R        |
| 02  | Fosfomycine                | FOS   | 50 µg            | 42             | S        |
| 03  | Rifampicine                | RA    | 15 µg            | 36             | S        |
| 04  | Tétracycline               | TE    | 30 µg            | 20             | S        |
| 05  | Vancomycine                | VA    | 30 µg            | 14             | R        |
| 06  | Gentamicine                | G     | 10 µg            | 21             | S        |
| 07  | Trimethoprim/<br>sulfamide | SXT   | 1.25 /23,75µg    | 24             | S        |
| 08  | Erythromycine              | E     | 15UI             | 0              | R        |
| 09  | Oxacilline                 | OX    | 5 µg             | 19             | R        |
| 10  | Amikacine                  | AN    | 30 µg            | 15             | I        |



**Figure 17:** Antibiogramme de la souche de référence cible X<sub>1</sub>.

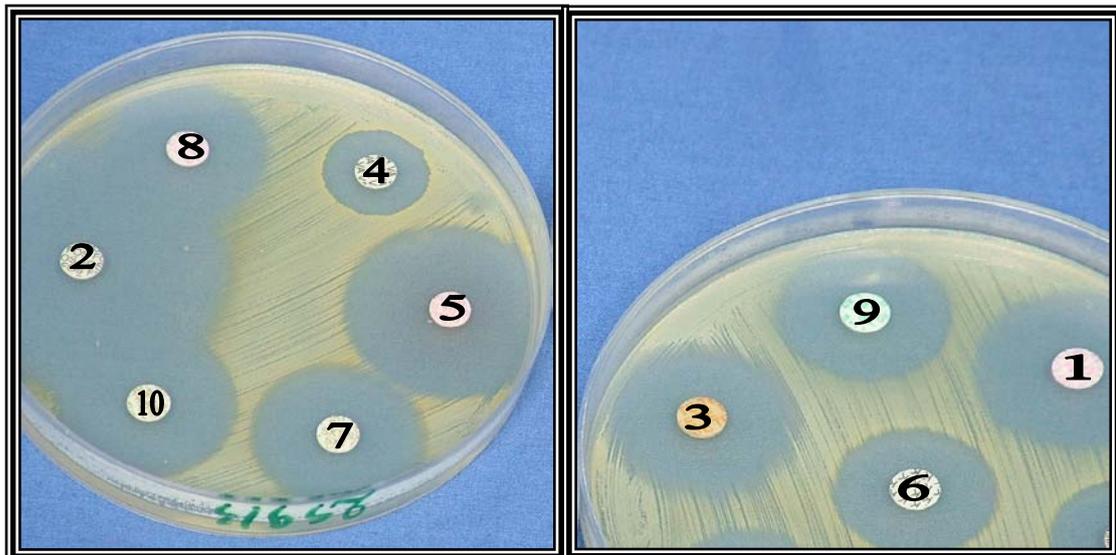
**7.2- *Staphylococcus aureus* X<sub>2</sub>ATCC :**

Les résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible X<sub>2</sub> sont représentés dans Le tableau 21

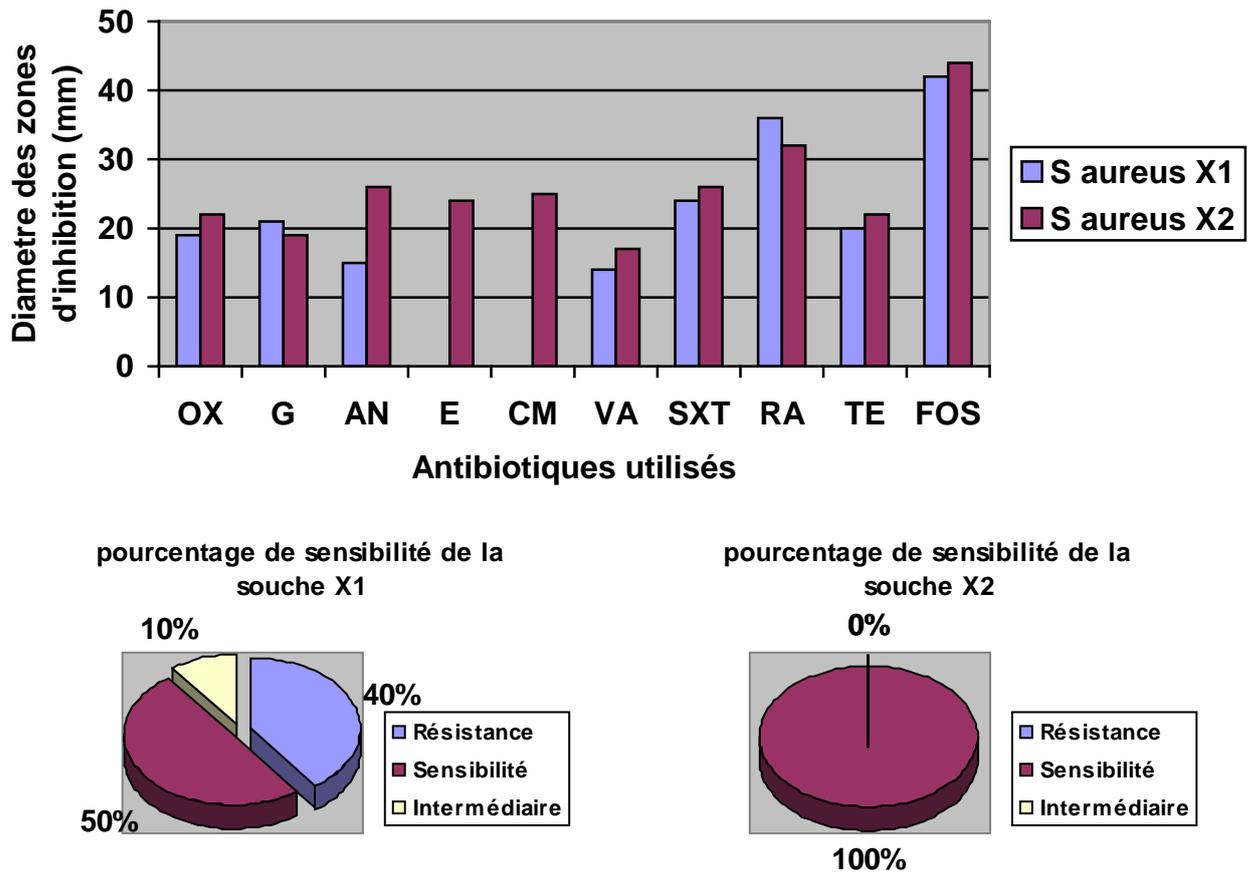
l'antibiogramme de la souche de référence cibleX<sub>2</sub> est présenté dans La figure18

**Tableau 21** : Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible x2.

| N°= | Dénominations communes      | Signe | Charge du disque     | Diamètre en mm | résultat |
|-----|-----------------------------|-------|----------------------|----------------|----------|
| 01  | Clindamycine                | CM    | 2 µg                 | 25             | S        |
| 02  | Fosfomycine                 | FOS   | 50 µg                | 44             | S        |
| 03  | Tétracycline                | TE    | 30 µg                | 22             | S        |
| 04  | Vancomycine                 | VA    | 30 µg                | 17             | S        |
| 05  | Rifampicine                 | RA    | 15 µg                | 32             | S        |
| 06  | Gentamycine                 | G     | 10 µg                | 19             | S        |
| 07  | Trimethoprime/<br>sulfamide | SXT   | 1.25 µg/<br>23,75 µg | 26             | S        |
| 08  | Erythromycine               | E     | 15UI                 | 24             | S        |
| 09  | Oxacilline                  | OX    | 1 µg                 | 22             | S        |
| 10  | Amikacine                   | AN    | 30 µg                | 26             | S        |



**Figure18:** Antibiogramme de la souche de référence cible X<sub>2</sub>.



**Figure 19** : Antibiogramme des deux souches de références *S.aureus* X<sub>1</sub> et X<sub>2</sub>.

La figure 19 montre que la souche de référence *S.aureus* X<sub>2</sub> est sensible aux antibiotiques testés. La souche X<sub>1</sub> résiste aux antibiotiques suivants :

- deux antibiotiques qui appartiennent à la famille des macrolides et qui ont un spectre d'action limité : Coques Gram + et -, Bacilles Gram + : l'Erythromycine et La Clindamycine (Lincomycines) (CHRISTOL D., 1978) [109].
- Groupe de la méthicilline qui résiste aux pénicillinase du Staphylocoque aureus : la méthicilline d'après la référence de la souche ATCC (MRSA : Méthicilline Résistant *Staphylococcus aureus*) et l'Oxacilline (CHRISTOL D., 1978) [109].
- Un antibiotique appartenant à la famille des glycopeptides la vancomycine qui a un spectre étroit : Gram+ et qui est utilisé dans les traitement des infections dues aux Staphylococcus (MRSA) (NAOKI M., 1999) [110].

Ces résultats confirment la multirésistance de la souche *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub> (MRSA).

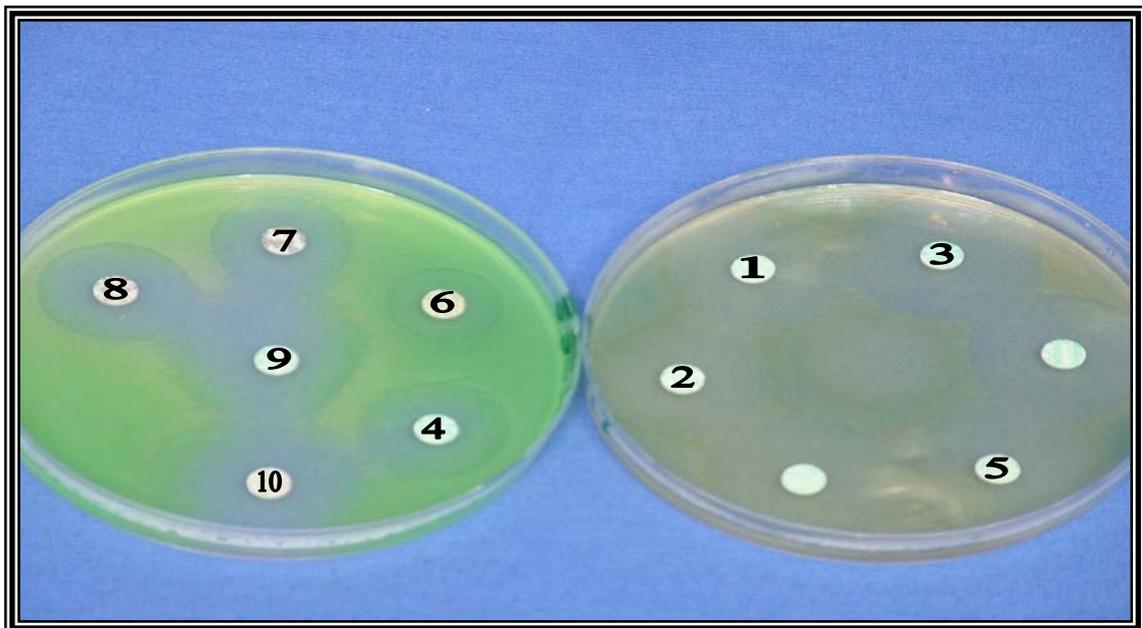
### 7.3 – *Pseudomonas aeruginosa* Y ATCC:

L'antibiogramme de la souche de référence cible Y est présenté dans la figure 20.

Les résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible Y sont représentés dans le tableau 22.

**Tableau 22** : Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible Y.

| N°= | Dénominations communes           | Signe | Charge du disque | Diamètre en mm | Résultat |
|-----|----------------------------------|-------|------------------|----------------|----------|
| 01  | Ticarcilline                     | TIC   | 75 µg            | 25             | S        |
| 02  | Ticarcilline +Acide clavulanique | TCC   | 75/10 µg         | 25             | S        |
| 03  | Pipéracilline                    | PIP   | 75 µg            | 30             | S        |
| 04  | Imipeneme                        | IPM   | 10 µg            | 22             | S        |
| 05  | Ceftazidime                      | CAZ   | 30 µg            | 29             | S        |
| 06  | Gentamicine                      | G     | 10 µg            | 14             | I        |
| 07  | Amikacine                        | AN    | 30 µg            | 20             | S        |
| 08  | Tobramycine                      | TM    | 10 µg            | 22             | S        |
| 09  | Aztreonam                        | ATM   | 10 µg            | 28             | S        |
| 10  | Ciprofloxacine                   | CIP   | 5 µg             | 28             | S        |



**Figure 20** : AntibioGramme de la souche de référence cible y1.

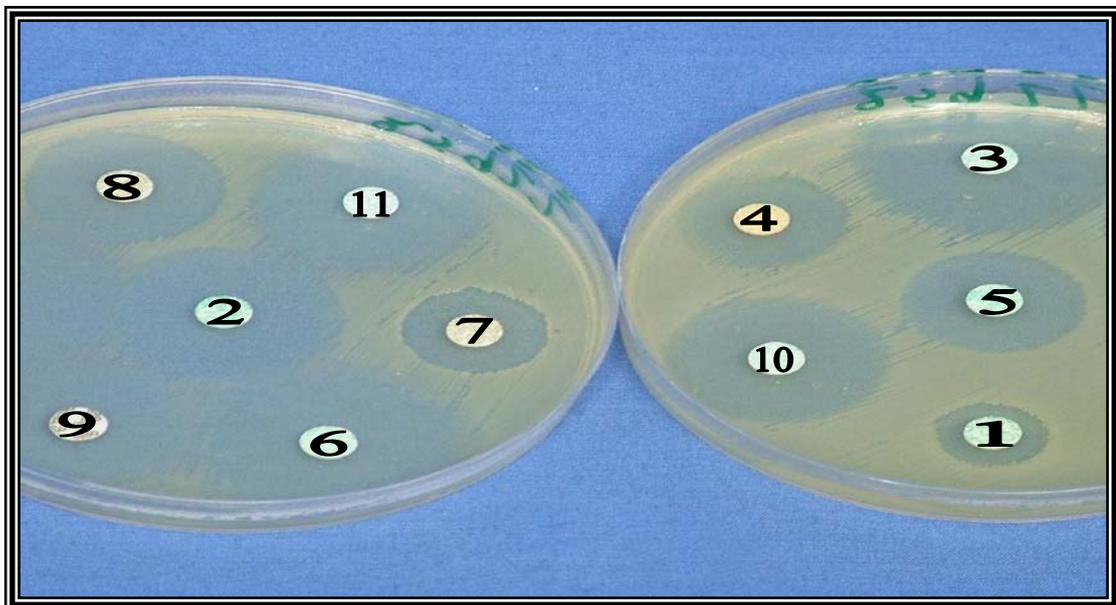
**7.4-Escherichia coli Z ATCC Z:**

Les résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible Z sont représentés dans le tableau 23.

L'antibiogramme de la souche de référence cible Z est présenté dans la figure 21.

**Tableau 23** : Résultats de l'antibiogramme de la souche de référence cible Z.

| N°= | Dénominations communes           | Signe | Charge du disque     | Diamètre en mm | résultat |
|-----|----------------------------------|-------|----------------------|----------------|----------|
| 01  | Ampicilline                      | AM    | 10 µg                | 13             | R        |
| 02  | Cefoxitine                       | FOX   | 30 µg                | 27             | S        |
| 03  | Cefotaxime                       | CTX   | 30 µg                | 30             | S        |
| 04  | Fosfomycine                      | FOS   | 50 µg                | 23             | S        |
| 05  | Amoxicilline+ Acide clavulanique | AMC   | 20 µg+10 µg          | 20             | S        |
| 06  | Imipeneme                        | IPM   | 10 µg                | 30             | S        |
| 07  | Gentamycine                      | G     | 10 µg                | 19             | S        |
| 08  | Trimethoprim+ sulfamide          | SXT   | 1.25 µg+<br>23,75 µg | 22             | S        |
| 09  | Amikacine                        | AN    | 30 µg                | 24             | S        |
| 10  | Furanes                          | FT    | 300 µg               | 25             | S        |
| 11  | Chloramphenicol                  | C     | 30 µg                | 27             | S        |



**Figure 21** : Antibiogramme de la souche de référence cible Z.

Les deux souches de références à Gram négatif : *P.aeruginosa* ATCC Y et *E.coli* ATCC Z ont montré une sensibilité aux antibiotiques testés sauf que la souche *E.coli* ATCC résiste à l'ampicilline qui appartient à la famille des  $\beta$ -lactamines et plus précisément au pénicillines à large spectre d'action, elle présente donc une simple résistance.

Dans le but de sélectionner les souches d'actinomycètes productrices d'antibiotiques en vue de les étudier de manière plus approfondie, elles ont été testées sur le milieu ISP2 solide et liquide contre les souches de références déjà étudiées .

### 8- TEST DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE IN VITRO SUR MILIEU SOLIDE :

Les résultats du test de la production du métabolite antibactérien sur milieu solide sont représentés dans le tableau 24.

**Tableau 24 :** Résultats du test de la production du métabolites antibactérien sur milieu solide.

| N° de souches d'Actinomycètes Actives | Activité antibactérienne (en mm) |                                |                       |                 |
|---------------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------|
|                                       | <i>S.aureus</i> X <sub>1</sub>   | <i>S.aureus</i> X <sub>2</sub> | <i>P.aeruginosa</i> Y | <i>E.coli</i> Z |
| S3                                    | 12                               | 8                              | 0                     | 0               |
| S10                                   | 18                               | 15                             | 0                     | 0               |
| S23                                   | 0                                | 0                              | 8                     | 0               |
| S24                                   | 8                                | 8                              | 0                     | 0               |
| S25                                   | 11                               | 0                              | 0                     | 0               |

Les résultats du test de la production du métabolite antibactérien sur milieu solide ont montré :

- L'absence d'activité antibactérienne sur la souche de référence cible *Escherichia coli* Z ATCC (Gram négatif).
- Une très faible activité antibactérienne de la Souche 23 sur la souche de référence cible *Pseudomonas aeruginosa* Y (Gram négatif), avec une zone d'inhibition de 08 mm de diamètre.
- Une activité antibactérienne plus ou moins importante des souches : 3, 10, 24 et 25 sur les deux souches de références cibles : *Staphylococcus aureus* X1 ATCC (MRSA) et *Staphylococcus aureus* x2 ATCC (Gram positif).
- La souche 10 est la plus performante par une activité antibactérienne très importante sur la souche de référence cible *Staphylococcus aureus* X1 ATCC (MRSA), avec une zone d'inhibition de 16mm de diamètre.
- Les bactéries Gram négatif étant souvent moins sensibles aux antibiotiques que les Gram positif à cause de la présence d'une membrane externe qui rend leur paroi beaucoup moins perméable (TOUSSAINT V., 1996) [111] et (pelczar et al., 1985)[112].

### 9- TEST DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE IN VITRO SUR MILIEU LIQUIDE :

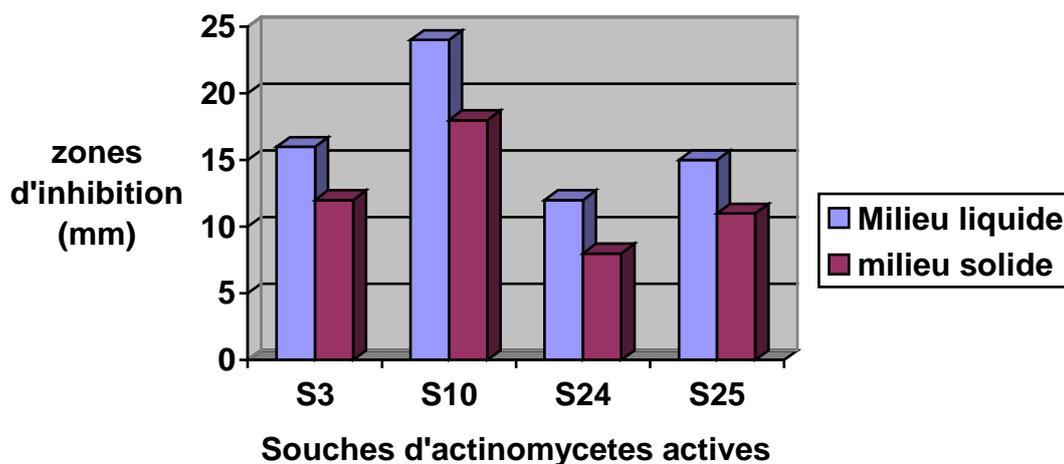
Les résultats du test de la production du métabolite antibactérien sur milieu liquide sont représentés dans le tableau 25.

**Tableau 25** : Résultats du test de la production du métabolite antibactérien sur milieu liquide.

| N° de souche d'Actinomycètes | Activité antibactérienne (en mm) |                                |                       |                 |
|------------------------------|----------------------------------|--------------------------------|-----------------------|-----------------|
|                              | <i>S.aureus</i> X <sub>1</sub>   | <i>S.aureus</i> X <sub>2</sub> | <i>P.aeruginosa</i> Y | <i>E.coli</i> Z |
| S3                           | 16                               | 12                             | 0                     | 0               |
| S10                          | 24                               | 19                             | 0                     | 0               |
| S23                          | 0                                | 0                              | 12                    | 0               |
| S24                          | 12                               | 12                             | 0                     | 0               |
| S25                          | 15                               | 0                              | 0                     | 0               |

Les résultats de l'activité antibactérienne sur milieu liquide ont montrés que les souches d'actinomycètes actives sur les souches de référence cibles utilisées sont les même que celles révélées lors du test d'activité sur milieu solide mais plus importante. L'activité sur la souche de référence *Staphylococcus aureus* X<sub>1</sub> ATCC (MRSA) est toujours très importante et spécialement celle de la souche 10 dont la zone d'inhibition atteint les 24mm.

La figure 22 représente la comparaison des zones d'inhibition des souches d'actinomycètes actives sur la souche de référence cible *Staphylococcus aureus* x1 ATCC (MRSA) sur milieu liquide et solide.



**Figure 22** : Zones d'inhibition de la souche de référence *Staphylococcus aureus* X<sub>1</sub> ATCC (MRSA) après contact avec le métabolite antibactérien obtenus sur milieu liquide et solide.

La comparaison des zones d'inhibition des souches d'actinomycètes actives sur la souche de référence cible *Staphylococcus aureus* x1 ATCC(MRSA) sur milieu liquide et

solide a montré que la production du métabolite antibactérien est plus importante sur le milieu liquide que sur le milieu solide, ceci s'accorde avec les résultats de (ZITOUNI A.,2005) [103], (SULTANA Z.,2002)[105], (MELOULI L.,2003) [106], (HILALI L.,2002)[101] et (SLAVICA B.,2005) [108] qui ont montrés que la production d'antibiotique est meilleur sur le milieu de culture liquide, mais certaines espèces du genre *Actinomadura* ont la particularité de ne pousser que sur des milieux solides. En ce qui concerne la production d'antibiotique, il existe des exemples de souches d'actinomycètes poussant sur milieu liquide mais ne produisant de substances actives que sur milieu solide d'après certains auteurs (BADJI B., 2005) [104], (IWAI Y.,1982)[113] et (SHOMURA S.,1979) [114], ce qui nous a poussé à procéder au criblage sur les deux milieux liquide et solide.

Après les résultats du test de l'activité antibactérienne, la souche 10 est la plus performante par son activité sur la souche de référence cible *Staphylococcus aureus* X<sub>1</sub> ATCC (MRSA), connue par sa multirésistance et particulièrement à la vancomycine, antibiotique utilisé pour le traitement des infections causées par *S.aureus* (MRSA). Pour cela nous n'avons suivi la production du métabolite antibactérien qu'à partir de cette souche sur les deux milieux liquide ISp2 et ISP1 (BADJI B., 2005) [104], en commençant par l'étude de la cinétique de production d'antibiotique en vue de déterminer la phase propice à une meilleure production de l'antibiotique afin de procéder à son extraction.

### 10- LA PRODUCTION DU METABOLITE ANTIBACTERIEN EN MILIEU LIQUIDE :

Après les essais préliminaires, nous avons optimisé les conditions expérimentales puis avons suivi la cinétique de production pendant 10 jours (BADJI B., 2005) [104], les résultats de la cinétique de production sont présentés dans les tableaux 26 et 27.

**Tableau 26** : Résultats de la cinétique de production de la souche10 sur le milieu ISp2.

| Temps (par jours)                | 2 <sup>eme</sup> jours | 3 <sup>eme</sup> jours | 4 <sup>eme</sup> jours | 5 <sup>eme</sup> jours | 6 <sup>eme</sup> jours | 7 <sup>eme</sup> jours | 8 <sup>eme</sup> jours | 9 <sup>eme</sup> jours | 10 <sup>eme</sup> jours |
|----------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-------------------------|
| Activité Antibactérienne (en mm) | 0                      | 0                      | 15                     | 17                     | 24                     | 24                     | 24                     | 24                     | 24                      |
| pH                               | 6.52                   | 5.94                   | 5.30                   | 5.48                   | 6.83                   | 7.52                   | 7.69                   | 8.00                   | 8.18                    |

**Tableau 27** : Résultats de la cinétique de production de la souche 10 sur le milieu ISp1.

| Temps<br>(par jours)                   | 2 <sup>eme</sup><br>jours | 3 <sup>eme</sup><br>jours | 4 <sup>eme</sup><br>jours | 5 <sup>eme</sup><br>jours | 6 <sup>eme</sup><br>jours | 7 <sup>eme</sup><br>jours | 8 <sup>eme</sup><br>jours | 9 <sup>eme</sup><br>jours | 10 <sup>eme</sup><br>jours |
|--|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| Activité<br>Antibactérienne<br>(en mm) | 0                         | 0                         | 0                         | 0                         | 14                        | 17                        | 17                        | 17                        | 17                         |
| pH                                     | 7.68                      | 7.70                      | 7.74                      | 7.77                      | 7.86                      | 8.14                      | 8.47                      | 8.71                      | 8.90                       |

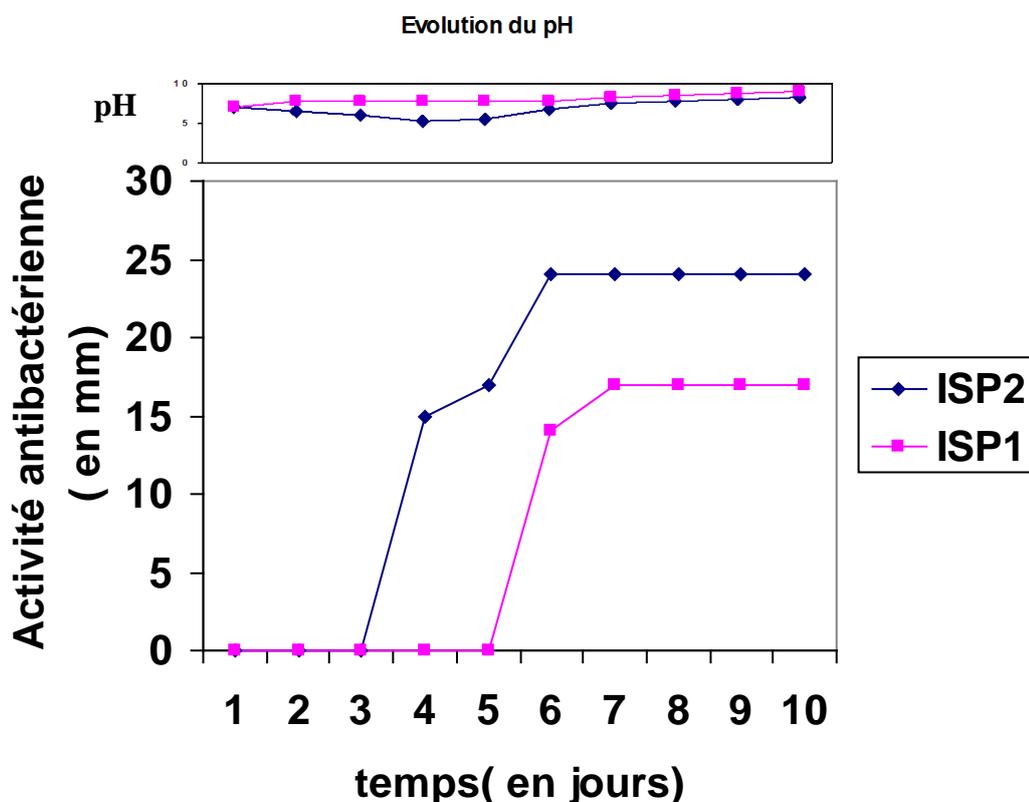
Les résultats ont montrées que :

- la production du métabolite antibactérien à partir de la souche 10 dans le milieu liquide **ISP2** commence à partir du 4<sup>eme</sup> jours d'incubation et le pH passe de 7 à un pH acide de 5.30, avec une zone d'inhibition de 15mm jusqu'à 24 mm au 6<sup>eme</sup> jours avec un pH de 7.52. Après le 6<sup>eme</sup> jours la zone d'inhibition reste constante.
- Le pH évolue vers l'acidité les premiers jours de 7.00 à 5.30 jusqu'au 4<sup>eme</sup> (1<sup>ier</sup> jours de la production) puis remonte progressivement vers l'alcalinité jusqu'au pH de 8.18 au 10<sup>eme</sup> jours d'incubation.
- la production du métabolite antibactérien à partir de la souche 10 dans le milieu liquide **ISp1** commence à partir du 6<sup>eme</sup> jours d'incubation à un pH proche de la neutralité (7.86) avec une zone d'inhibition de 14 mm jusqu'à 17mm au 7<sup>eme</sup> jours et un pH alcalin (8.14).Après le 7<sup>eme</sup> jours la zone d'inhibition reste constante.
- Le pH évolue vers l'alcalinité a partir du 2<sup>eme</sup> jours avec un pH de 7.86 jusqu'a 8.90 au 10<sup>eme</sup> jours d'incubation.

Le pH optimal de la croissance et de la production des métabolites secondaires dépend des nutriments (composition des milieux de cultures).L'intervalle minimal de la production des métabolites secondaires étant entre 4,5 et 7 et le maximal entre 8,5 et 11,5 ( Kontro M.et al.,2005) [115], ce qui explique la différence de l'évolution du pH entre les deux milieux de cultures ISP1 et ISP2 lors de la cinétique de production et entre leur pH optimaux de production. Sur le milieu ISP2 à partir d'un pH acide de 5.3 pour arriver à un maximum de production à pH de 6,3 et sur le milieu ISP1 à partir d'un pH proche de la neutralité 7.86 pour arriver à un maximum de production à pH de 8,14.

L'évolution du pH du milieu de culture ISP2 vers l'acidité au début de la cinétique de production d'antibiotique est due à la source de carbone qui est le glucose qui conduit à la production d'acides organiques qui vont abaisser le pH du milieu (SUROWITZ K.G. et al.,1985) [116]. Les milieux qui ne contiennent pas de source de carbone telles le glucose et les sucres, leurs pH n'évolue pas vers l'acidité par manque de production d'acide organique si ce n'est une faible production à partir des acides aminés, ce qui explique la non évolution du pH du milieu de culture ISP1 vers l'acidité (MADDEN T. et al., 1996)[117].

La cinétique de production d'antibiotique de la souche 10 sur les deux milieux de cultures liquides est présentée dans la figure 23.



**Figure 23 :** La cinétique de production d'antibiotique de la souche 10 sur les deux milieux de cultures liquides avec l'évolution du pH.

- l'activité antibactérienne est différente sur les deux milieux, elle est plus importante sur le milieu ISP2 (24mm) que sur le milieu ISP1 (17mm), et tardive sur le milieu ISP1 (6<sup>ème</sup> jours d'incubation), cela est du à la source de carbone du milieu ISP2 le glucose, ce dernier représente la meilleur source de carbone pour la production d'antibiotique selon les résultats rapportés par (ANURAG P. et al.,2005) [118].

## 11- TESTS DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE A PARTIR DES EXTRAITS :

### 11.1-Tests de l'activité antibactérienne des extraits à partir du filtrat :

Les résultats des tests de l'activité antibactérienne des extraits à partir du filtrat sont représentés dans le tableau 28 et les zones d'inhibitions des extraits du filtrat sont présentées dans la figure 24.

**Tableau 28** : Résultats des tests d'activité antibactérienne des extraits à partir du filtrat

| Souches d'actinomycètes                          | Souche 10  |
|--|--|
| Souche de référence cible<br>Solvants Organiques | <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>1</sub> ATCC (MRSA)<br>Activité anti bactérienne (en mm) |
| n- hexane  | Activité antibactérienne nulle (0mm)   |
| Dichlorométhane                                  | Activité antibactérienne forte (24mm)  |
| n- butanol                                       | Activité antibactérienne nulle (0mm)   |
| acétate d'éthyle                                 | Activité antibactérienne faible (8mm)  |

L'extraction effectuée à l'aide de solvants non miscible à l'eau est de polarités différentes (ZITOUNI A.et al.,2005) [103] et (BADJI B., 2005) [104] montre que l'activité contre la souche *Staphylococcus aureus* X<sub>1</sub>ATCC(MRSA) est meilleur avec le dichloromethane (24mm),faible avec l'acétate d'éthyle et nulle avec le n-hexane et le n-butanol.

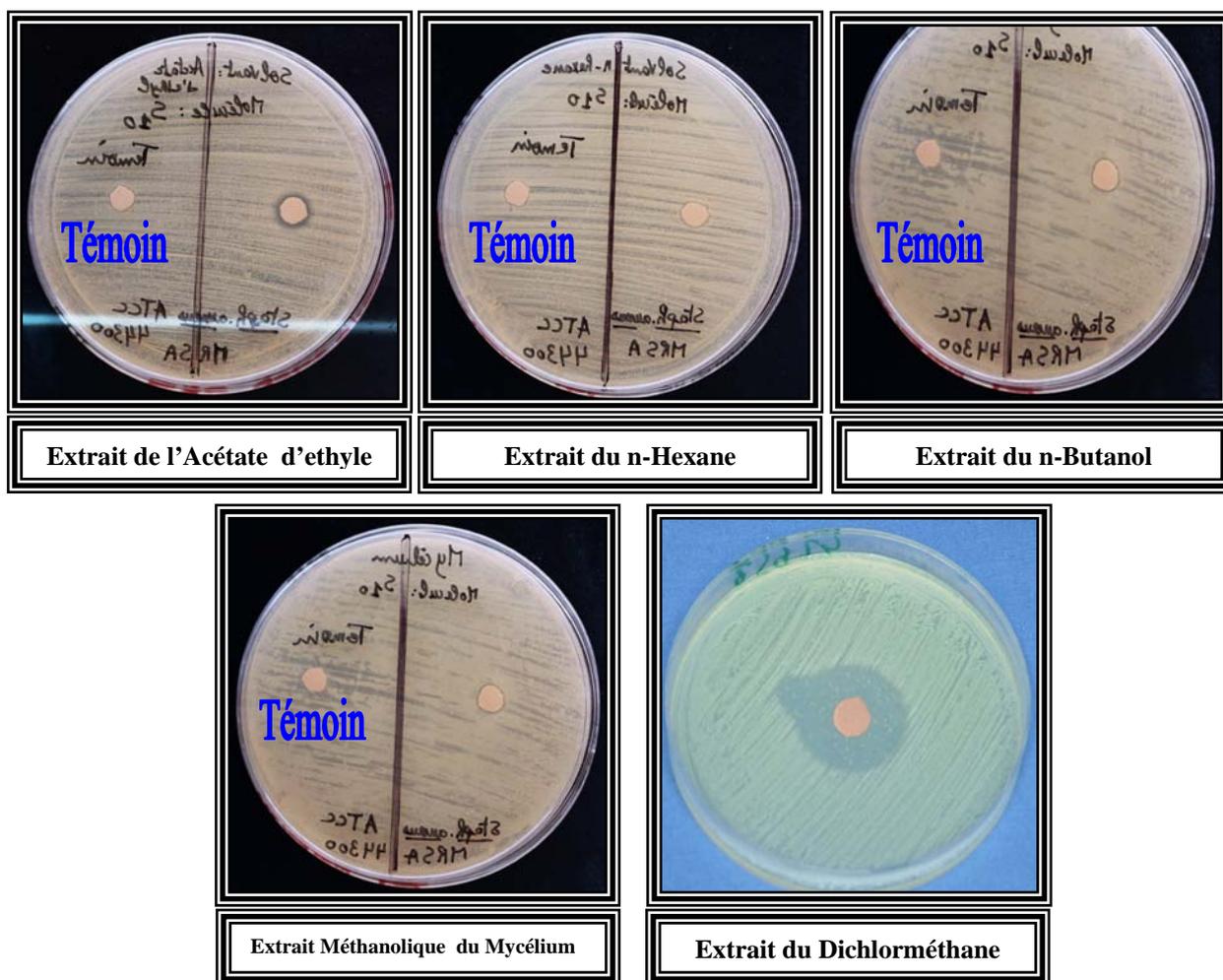
### 11.2- TEST DE L'ACTIVITE ANTIBACTERIENNE DE L'EXTRAIT METHANOLIQUE DU MYCELIUM :

Les résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du mycelium sont représentés dans le tableau 29 et la zone d'inhibition de ce dernier est présentée dans la figure24.

**Tableau 29** : Résultats du test de l'activité antibactérienne de l'extrait méthanolique du mycélium.

|                           |   |
|---------------------------|---|
| Souches d'actinomycètes   | Souche 10   |
| Souche de référence cible | <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>1</sub> ATCC (MRSA) |
| Solvants Organiques       | Activité anti bactérienne (en mm)                       |
| Méthanol                  | Activité antibactérienne faible (8mm)                   |

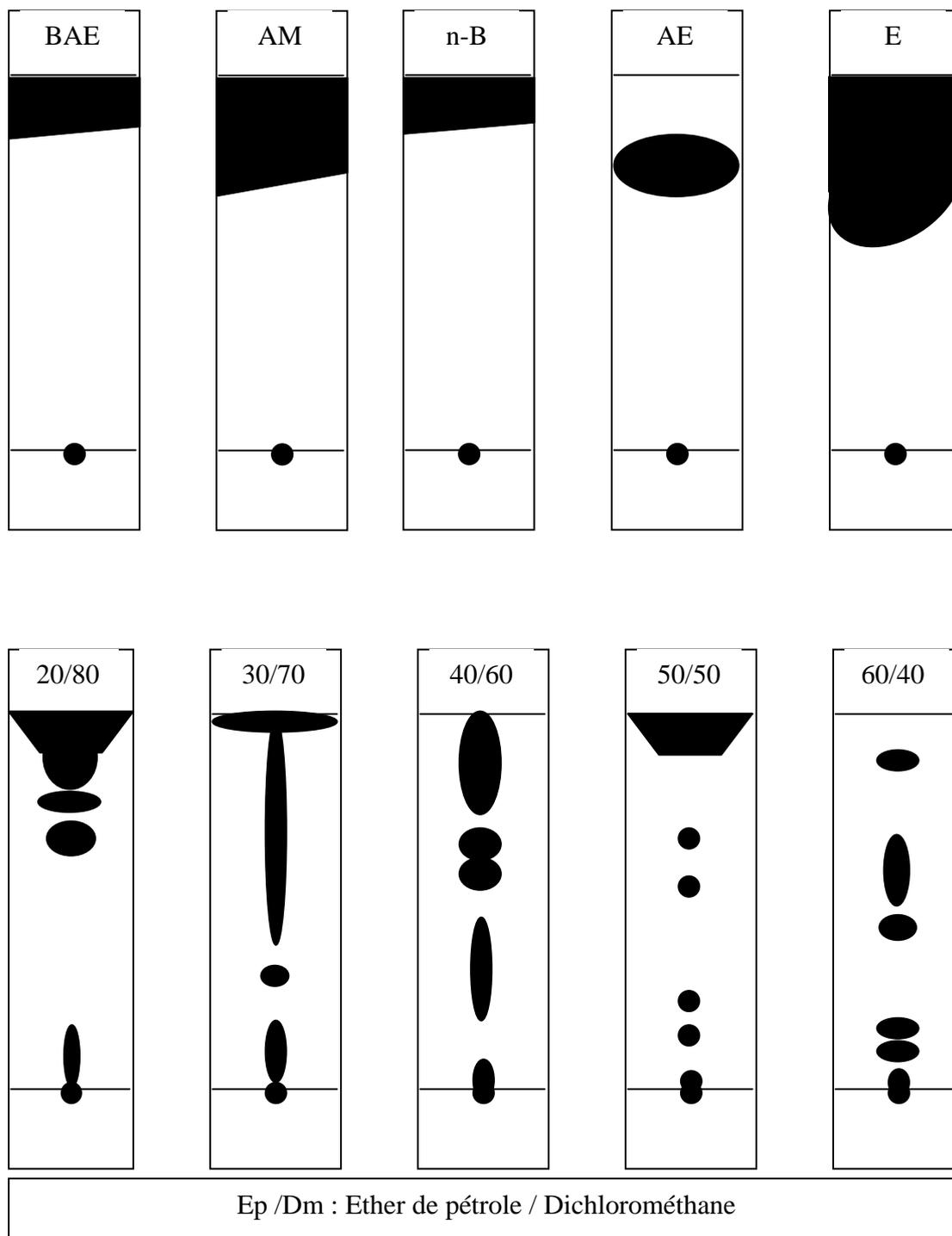
L'extrait méthanolique du mycélium montre une activité trois fois plus faible que celle obtenue à partir de l'extrait du dichlorométhane du filtrat, ces résultats s'accordent avec ceux rapportés par (BOUTI K.,1997) [100] . Nous avons donc poursuivi nos études sur l'extrait du dichlorométhane, d'autant plus que l'extrait mycélien est souvent chargé de lipides membranaires qui gênent la purification [100].



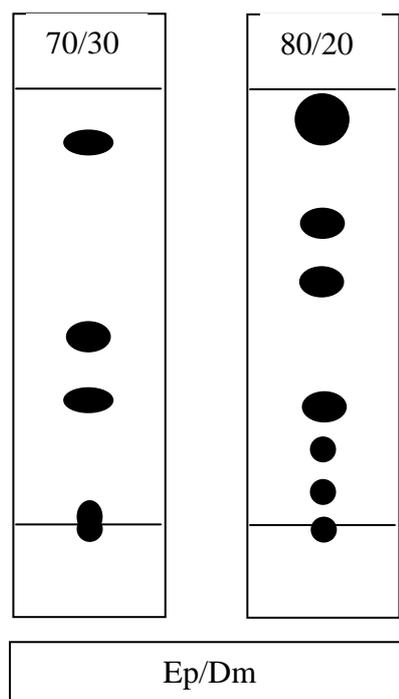
**Figure 24** : Zones d'inhibition des extraits du filtrat et du mycélium

12- LA CHROMATOGRAPHIE SUR COUCHE MINCE :

Les résultats des essais de la séparation des produits de l'extrait du dichlorométhane par la chromatographie sur couche mince sont représentés sur les figures 25 et 26



**Figure 25** : Séparation des produits de l'extrait du dichlorométhane par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes de solvants



**Figure 26 :** Séparation des produits de l'extrait du dichlorométhane par chromatographie sur couche mince en utilisant différents systèmes de solvants.

Le filtrat de culture une fois débarrassé de certaines impuretés après extraction au dichlorométhane, est analysé par bioautographie sur couche mince (séparation des produits de l'extrait), afin de localiser les produits actifs ; et les tester sur la souche de référence test *S.aureus* X<sub>1</sub> ATCC.

Au début, des systèmes de solvants de migration, couramment utilisés pour séparer les antibiotiques, ont été employés : le n-butanol-acide acétique-eau (3-1-1, en volume) « B.A.E », l'acétate d'éthyle –méthanol (100-15 v/v) « A.M », n-butanol pure, Acetate d'éthyle pure « AE » et l'éthanol pure « E ». Les résultats ont montrés que tous les produits de l'extrait du dichlorométhane migrent au fond de la plaque de CCM (mélange).

Ensuite, le système de solvants de migration composé d'un solvant plus ou moins polaire, le dichlorométhane, et un autre apolaire, l'éther de pétrole a été utilisé à différentes proportions « Ep/Dm » (20, 80), (30, 70), (40, 60), (50, 50), (60, 40), (70, 30), (80, 20).

Les résultats ont montrés qu'une seule proportion (80/20) est efficace pour la séparation de tous les produits de l'extrait du dichlorométhane qui sont au nombre de six (06).

Par la suite les six (06) produits de l'extrait du dichlorométhane sont séparés par l'utilisation de la chromatographie à gel de silice sur colonne en utilisant le système d'élution Ether de pétrole /Dichlorométhane avec la proportion (80/20).

Après la séparation et l'obtention des produits de l'extrait du dichlorométhane, ils sont testés sur la souche *S.aureus* X<sub>1</sub>ATCC (MRSA) en vue de révéler ceux qui sont actifs.

Les résultats du test de l'activité des produits de l'extrait du dichlorométhane sur la souche de référence cible *S.aureus* X<sub>1</sub> ATCC (MRSA) sont représentés dans le tableau 30.

**Tableau 30** : Résultats du test de l'activité des produits de l'extrait du dichlorométhane.

| Souche de référence cible<br>produits de l'extrait | <i>Staphylococcus aureus</i> X <sub>1</sub> ATCC (MRSA) |                 |
|--|---|-----------------|
|  | Activité antibactérienne                                | Rapport frontal |
| 1 <sup>ier</sup> produit élu                       | nulle (0mm)   | 0.03            |
| 2 <sup>eme</sup> produit élu                       | nulle (0mm)   | 0.10            |
| 3 <sup>eme</sup> produit élu                       | nulle (0mm)   | 0.22            |
| 4 <sup>eme</sup> produit élu                       | nulle (0mm)   | 0.50            |
| 5 <sup>eme</sup> produit élu                       | nulle (0mm)   | 0.66            |
| 6 <sup>eme</sup> produit élu                       | forte (24mm)  | 0.84            |

Les résultats du test de l'activités des produits de l'extrait du dichlorométhane sur la souche de référence cible *S.aureus* X<sub>1</sub>ATCC (MRSA) ont montrés qu'un seul produit est actif avec une zone d'inhibition de 24mm, c'est le dernier produit élu (le 6<sup>eme</sup>) et le plus polaire, et le seul a rester sur la colonne jusqu'à l'utilisation du méthanol comme éluant très polaire.

Le produit actif est de couleur jaune. Il est très polaire, son rapport frontal est de 0.84. Ce produit à la même couleur que celui obtenu (antibiotique) à partir d'une souche d'actinomycètes du genre *Streptomyces* par (Sultana Z. et al.,2002)[105], sa polarité ainsi que son rapport frontal sont proches de ceux des produits antibactériens obtenus à partir des souches d'actinomycètes par (SLAVICA B. et al.,2005)[108].

## Conclusion

Le but de ce travail consiste à sélectionner des souches d'actinomycètes productrices de substances antibactérienne vis à avis des infections nosocomiales.

Notre travail a permis d'isoler 22 souches d'actinomycètes à partir des eaux du lac Oubeira d'EL KALA en utilisant la technique de dilution et un nombre important de milieux de culture, simples, sélectifs et électifs. Lors de la sélection, nous nous sommes basés sur les caractères macromorphologiques et micromorphologiques des actinomycètes. Sur l'ensemble des souches isolées 68% proviennent du premier site du prélèvement (Nord du lac près de l'agglomération) ce qui montre sa richesse en actinomycetes et parmi eux 99% ont résisté au traitement à la chaleur 50°C pendant 10 minutes (Thermotolérantes). 31% des souches isolées sont obtenues sur le milieu Gausse qui, grâce à sa riche composition, a permis une bonne croissance au actinomycetes tout en augmentant la probabilité de les isoler.

Après les tests des propriétés antagonistes de l'ensemble des 22 souches isolées en utilisant des méthodes de criblage sur le milieu de culture ISP2 liquide et solide contre 4 souches de référence ATCC dont deux Bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>1</sub> (MRSA) multirésistante, *Staphylococcus aureus* ATCC X<sub>2</sub> sensible et deux autres à Gram négatif : *Pseudomonas aeruginosa* Y ATCC sensible, *Escherichia coli* Z ATCC qui présente une simple résistance contre l'ampicilline à large spectre d'action, nous avons pu sélectionner 5 souches d'actinomycetes actives (capables de produire des molécules antibactériennes) marquant bien que cette activité est révélée meilleure sur le milieu liquide que sur le milieu solide.

Parmi ces 5 souches actives, seule la S23 a une faible activité sur la souche à Gram négatif *P.aeruginosa* Y ATCC, les autres n'ayant d'activité que sur les souches à Gram positif. La souche S10 isolée à partir du centre du lac sur le milieu de culture Czapec simple concentration est la plus performante avec une zone d'inhibition de 24 mm. La multirésistance de la souche de référence X<sub>1</sub> nous a poussé étudier l'activité antibactérienne de la souche S10 contre celle-ci.

Afin de déterminer la phase propice à une meilleur production, nous avons suivi la cinétique de production du métabolite antibactérien par la souche S10 pendant 10 jours sur les deux milieux de culture liquides ISP1 et ISP2. Nous avons constaté que la production est meilleure sur le milieu ISP2, celle-ci commençant le 4<sup>eme</sup> jour d'incubation avec un pH acide de 5,3 résultat de la production d'acides organiques dû à l'utilisation du glucose comme source de carbone. Le pH évolue vers l'alcalinité pour arriver à un optimum de production à

un pH de 7,52 avec une zone d'inhibition importante de 24 mm à partir du 6<sup>ème</sup> jour et reste pendant le reste de la durée d'incubation.

Après la détermination de la meilleure phase de production nous avons procédé à l'extraction du métabolite antibactérien à la fois à partir du filtrat de la culture en milieu liquide et du mycélium en utilisant des solvants organiques de polarités différentes. Le test de l'activité de ces extraits sur la souche de référence X<sub>1</sub> a montré une meilleure activité avec le dichlorométhane (24mm), faible avec l'acétate d'éthyle (8mm) et nulle avec le n-hexane et le n-butanol. L'extrait méthanolique du mycélium montre une activité trois fois plus faible que celle obtenue à partir de l'extrait du dichlorométhane du filtrat. Nous avons donc poursuivi nos études sur l'extrait du dichlorométhane, d'autant que l'extrait mycélien est souvent chargé de lipides membranaires qui gênent la purification.

La chromatographie sur couche mince à gel de silice a permis de séparer les produits de l'extrait du dichlorométhane du filtrat qui sont au nombre de 6 et de connaître leur polarité et leur rapport frontal, ceci en utilisant le système de solvant Ether de pétrole /Dichlorométhane (80/20).

Suite à l'obtention des six produits de l'extrait du dichlorométhane du filtrat par la chromatographie sur colonne à gel de silice et au test de leur activité antibactérienne, un seul produit s'est révélé actif. Elu avec le méthanol (solvant très polaire) comme 6<sup>ème</sup> produit et dernier, il est très polaire de couleur jaune avec un rapport frontal de 0.84.

Nous concluons alors que le lac Oubeira d'EL KALA renferme des souches d'actinomycètes qui ont une activité antibactérienne surtout dans sa partie Nord. Parmi ces souches il en existe une qui a une très forte activité contre le *S.aureus* (MRSA) multi résistant grâce à la production d'un métabolite antibactérien très polaire avec un rapport frontale de 0.84 et de couleur jaune extractible par le solvant organique Dichlorométhane.

Le *Staphylococcus aureus* est la cause d'un grand nombre d'infections sévères, telles les septicémies, endocardites, pneumonies, infections des tissus mous, des os et des articulations. Malgré un traitement approprié, la mortalité due à ces infections sévères à Staphylocoques dorés reste élevée (20% à 30%). aujourd'hui, 90% des souches de *Staphylococcus aureus* sont non seulement résistantes à la pénicilline G mais aussi aux pénicillines à large spectre sensibles aux pénicillinases (CARBON C. et al., 1991) [119]. Ce qui montre l'importance de l'activité du métabolite antibactérien de la souche S10 sur le *S.aureus* (MRSA) multirésistant qui résiste à la vancomycine (glycopeptides) utilisé dans les traitements des infections dues à cet agent (NAOKI M., 1999) [110].

L'intérêt de ce métabolite dans le domaine médical et de la santé publique nécessite son étude d'une manière plus approfondie en procédant à :

- l'identification moléculaire de la souche S10 productrice de ce métabolite.
- l'optimisation de la production en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources de carbone et azotées, élément minéraux, température, aération et pH.).
- purification par chromatographie liquide à haute pression (HPLC).
- Etude de la solubilité et de la thermorésistance de cette molécule antibactérienne.
- Etude du spectre UV-Visible et du spectre infra rouge.
- La réalisation de la spectrométrie de masse, la résonance magnétique nucléaire du proton et du carbone 13 et l'analyse élémentaire, afin de déterminer la structure chimique de cette molécule antibactérienne.
- La réalisation des tests antagonistes contre de nombreux germes pathogènes à l'Homme et l'évaluation de la toxicité de l'antibiotique synthétisé envers ces organismes afin de savoir s'ils sont potentiellement intéressants dans le domaine pharmaceutique.
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices ( CMI).

# ANNEXES

ANNEXE 1 : Figures

1- Mode opératoire du système API 20E :

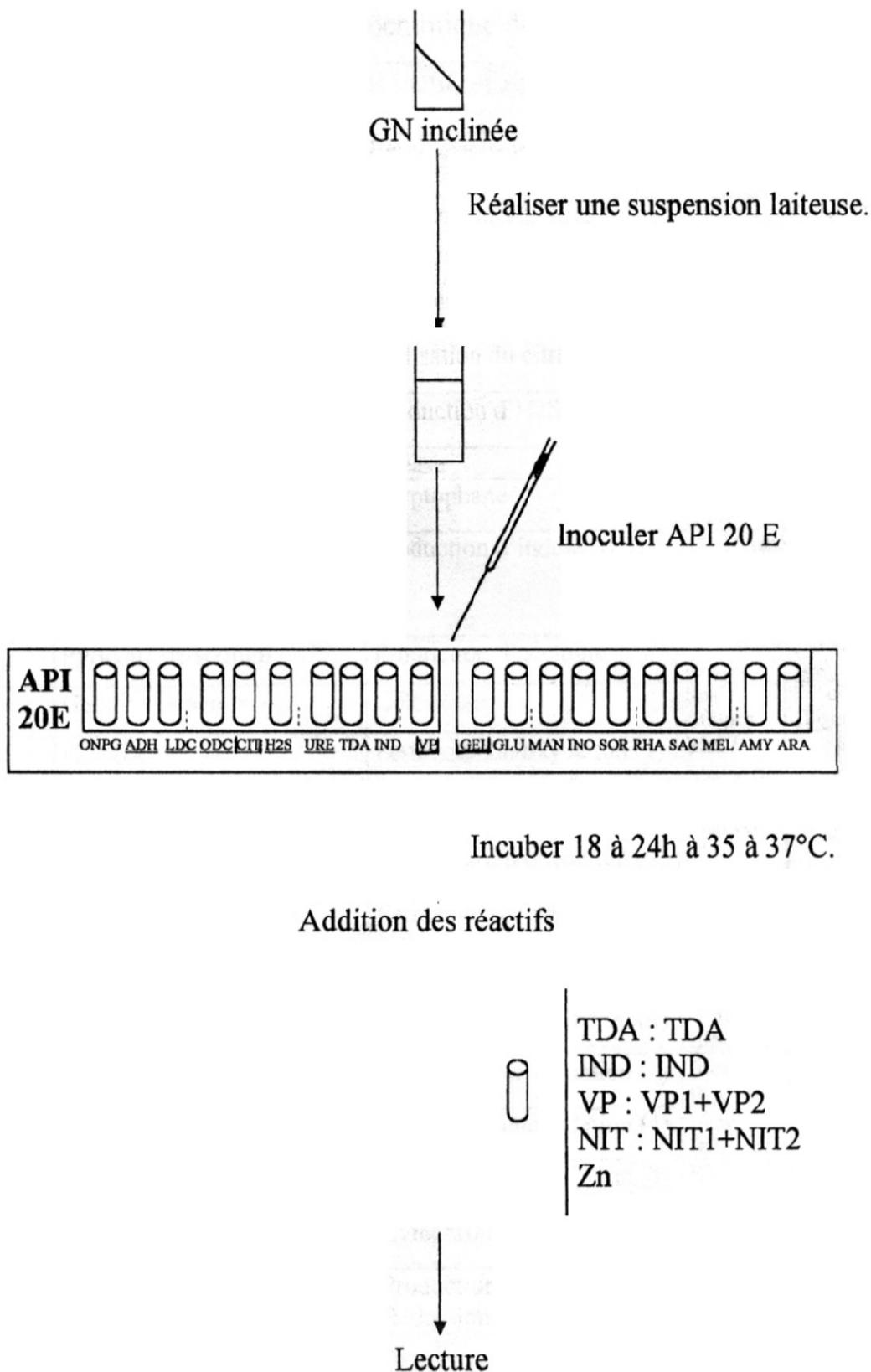


Figure 27 : Mode opératoire de la galerie API 20 E

## 2- Fiche de résultat du système API 20 E:

**api® 20 E**      CE 01723 C      REF : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_\_  
 Origine / Source / Herkunft /  
 Origen / Origen / Προέλευση /  
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :

BIOMÉRIEUX

ONPG   ADH   LDC   ODC   LCIJ   H<sub>2</sub>S   URE   TDA   IND   LVPJ   LGELJ   GLU   MAN   INO   SOR   RHA   SAC   MEL   AMY   ARA   OX   NO<sub>2</sub>   N<sub>2</sub>   MOB   McC   OF-0   OF-F

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Figure 28 : fiche de résultat du système API 20E.

## 3- Mode Opérateur de du Systeme API Staph :

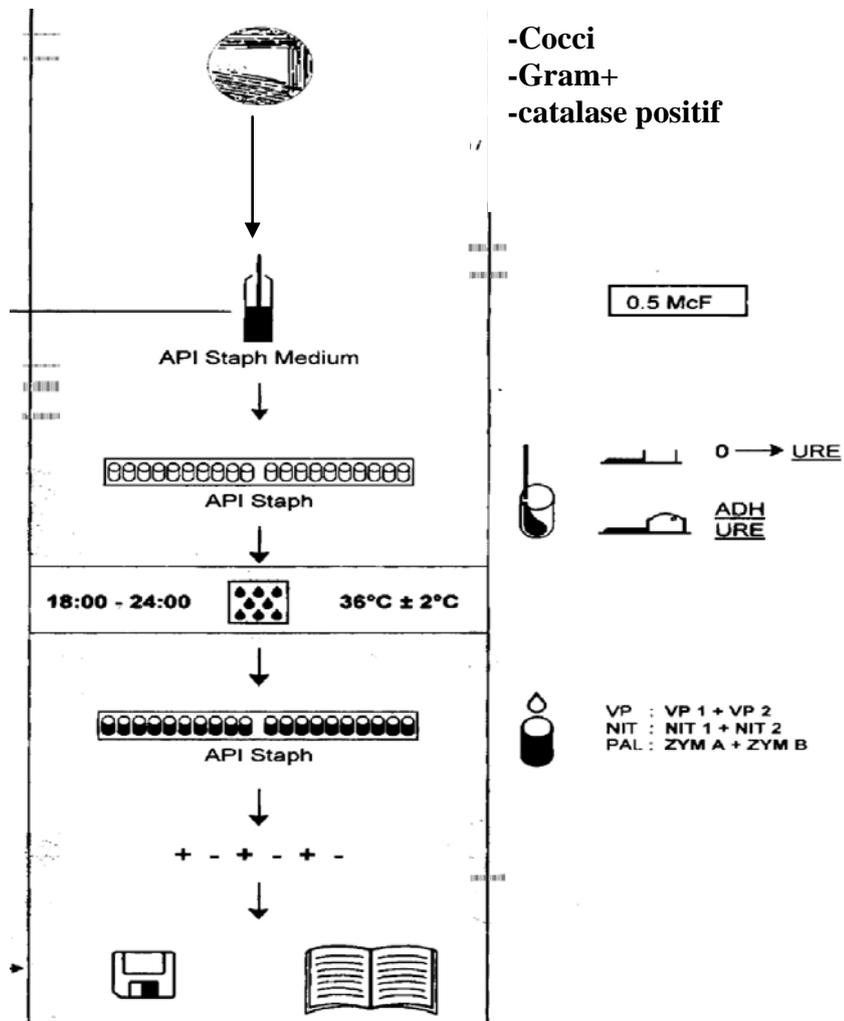


Figure 29 : Mode opératoire de la galerie Api Staph.

#### 4- Fiche de résultat du système API Staph :



CE 0722 B

REF : \_\_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft /  
Origen / Origen / Προέλευση /  
Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



1 2 4

0 GLU FRU

1 2 4

MNE MAL LAC

1 2 4

TRE MAN XLT

1 2 4

MEL NIT PAL

1 2 4

VP RAF XYL

1 2 4

SAC MDG NAG

1 2 4

ADH URE LSTR

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Figure 30 : Fiche de résultat du système API Staph.

#### 5- Mode Opérateur du système API 20NE

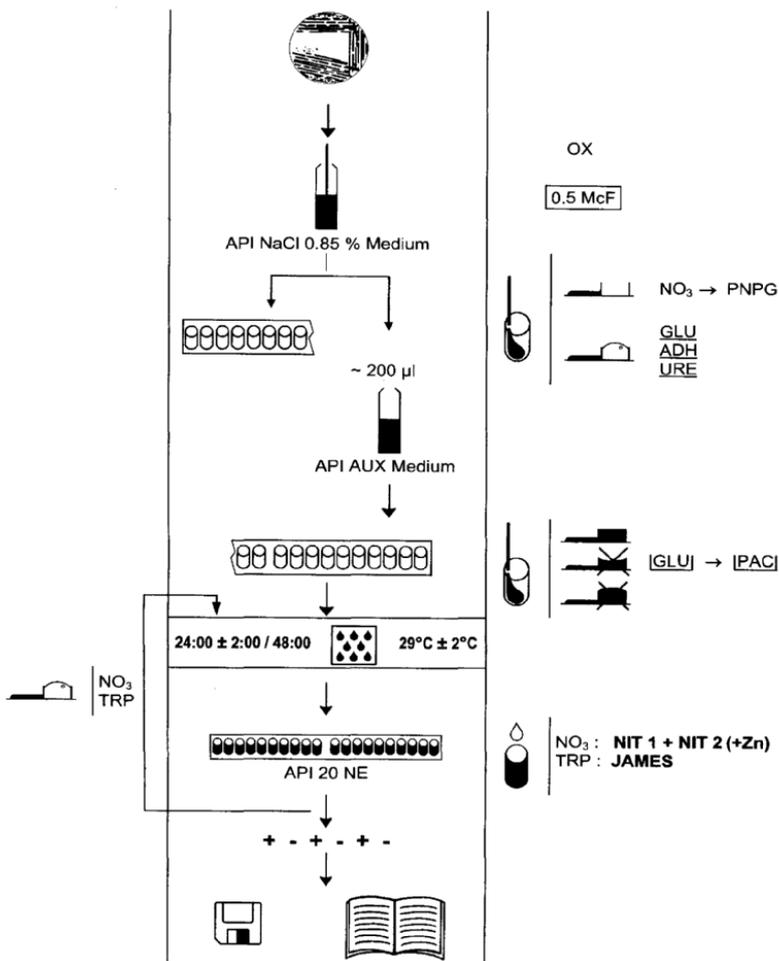


Figure 31 : Mode Opérateur de la Galerie API20NE.

## 6- Fiche de résultat du système API 20N E:


 07224 B

REF. : \_\_\_\_\_

Origine / Source / Herkunft /  
 Origen / Origen / Προέλευση /  
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie :



|      |      |                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |    |
|------|------|-----------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---|----|
| 24 h | 48 h | 1               | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4   | 1   | 2   | 4 | OX |
|      |      | NO <sub>3</sub> | TRP | GLU | ADH | URE | ESC | GEL | PNG | GLU | ARA | IME | MAN | NAG | MAL | GNT | CAP | ADJ | MLT | CTI | PAC |   |    |
| 24 h | 48 h |                 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |   |    |

Autres tests / Other tests / Andere Tests /  
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /  
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /  
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Imprimé en France / Printed in France

Figure 32 : Fiche de résultat du système API 20NE.

## ANNEXE 2: Tableaux

1- Tableau 31 : Tableau de lecture du système API 20E

| TESTS                                    | COMPOSANTS ACTIFS                  | QTE<br>(mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES   | RESULTATS                                |  |
|--|------------------------------------|------------------|---|--|--|
|  |                                    |                  |   | NEGATIF                                  | POSITIF                                  |
| ONPG                                     | 2-nitrophényl-βD-galactopyranoside | 0,223            | β-galactosidase<br>(Ortho NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase) | incoloré                                 | jaune (1)                                |
| ADH                                      | L-arginine                         | 1,9              | Arginine DiHydrolase  | jaune                                    | rouge / orangé (2)                       |
| LDC                                      | L-lysine                           | 1,9              | Lysine DeCarboxylase  | jaune                                    | rouge / orangé (2)                       |
| ODC                                      | L-ornithine                        | 1,9              | Ornithine DeCarboxylase                                       | jaune                                    | rouge / orangé (2)                       |
| [CIT]                                    | trisodium citrate                  | 0,756            | utilisation du Citrate  | vert pâle / jaune                        | bleu-vert / bleu (3)                     |
| H <sub>2</sub> S                         | sodium thiosulfate                 | 0,075            | production d'H <sub>2</sub> S                                 | incoloré / grisâtre                      | dépôt noir / fin liseré                  |
| URE                                      | urée                               | 0,76             | UREase  | jaune                                    | rouge / orangé (2)                       |
| TDA                                      | L-tryptophane                      | 0,38             | Tryptophane DésAminase  | jaune                                    | TDA / immédiat<br>marron-rougeâtre       |
| IND                                      | L-tryptophane                      | 0,19             | production d'INDole   | incoloré<br>vert pâle / jaune            | JAMES / immédiat<br>rose                 |
| [VP]                                     | sodium pyruvate                    | 1,9              | production d'acétone<br>(Voges Proskauer)                     | incoloré                                 | VP 1 + VP 2 / 10 min<br>rose / rouge (5) |
| [GEL]                                    | gélatine<br>(origine bovine)       | 0,6              | Gélatinase (GELatine)   | non diffusion                            | diffusion du pigment noir                |
| GLU                                      | D-glucose                          | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(GLUcose) (4)                     | bleu / bleu-vert                         | jaune / jaune gris                       |
| MAN                                      | D-mannitol                         | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(MANnitol) (4)                    | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| INO                                      | inositol                           | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(INOsitol) (4)                    | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| SOR                                      | D-sorbitol                         | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(SORbitol) (4)                    | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| RHA                                      | L-rhamnose                         | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(RHAmnose) (4)                    | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| SAC                                      | D-saccharose                       | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(SACcharose) (4)                  | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| MEL                                      | D-melibiose                        | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(MELibiose) (4)                   | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| AMY                                      | amygdaline                         | 0,57             | fermentation / oxydation<br>(AMYgdaline) (4)                  | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| ARA                                      | L-arabinose                        | 1,9              | fermentation / oxydation<br>(ARAbinose) (4)                   | bleu / bleu-vert                         | jaune                                    |
| OX                                       | (voir notice du test oxydase)      |                  | cytochrome-OXYdase  | (voir notice du test oxydase)            |  |
| Réduction<br>des<br>nitrates<br>tube GLU | potassium nitrate                  | 0,076            | production de NO <sub>2</sub>                                 | NIT 1 + NIT 2 / 2-5 min<br>jaune / rouge |  |
|  |                                    |                  | réduction au stade N <sub>2</sub>                             | Zn / 8 min<br>orange-rouge / jaune       |  |
| MOB                                      | API M Medium ou<br>microscope      |                  | mobilité  | immobile                                 | mobile                                   |
| McC                                      | milieu de MacConkey                |                  | culture   | absence                                  | présence                                 |
| OF-F<br>OF-O                             | glucose (API OF Medium)            |                  | fermentation : sous huile<br>oxydation : à l'air              | vert<br>vert                             | jaune<br>jaune                           |

2-Tableau 32 : Tableau de lecture du Système API Staph

| TESTS | COMPOSANTS ACTIFS             | QTE<br>(mg/cup.) | RÉACTIONS / ENZYMES                                      | RESULTAT                      |              |
|-------|-------------------------------|------------------|--|-------------------------------|--------------|
|       |                               |                  |  | NEGATIF                       | POSITIF      |
| 0     | Aucun                         |                  | Témoin négatif   | rouge                         | —            |
| GLU   | D-glucose                     | 1,56             | (Témoin positif) (D-GLUCose)                             |                               |              |
| FRU   | D-fructose                    | 1,4              | acidification (D-FRUctose)                               |                               |              |
| MNE   | D-mannose                     | 1,4              | acidification (D-MANnose)                                |                               |              |
| MAL   | D-maltose                     | 1,4              | acidification (MALtose)                                  |                               |              |
| LAC   | D-lactose<br>(origine bovine) | 1,4              | acidification (LACtose)                                  | rouge *                       | jaune        |
| TRE   | D-tréhalose                   | 1,32             | acidification (D-TREhalose)                              |                               |              |
| MAN   | D-mannitol                    | 1,36             | acidification (D-MANnitol)                               |                               |              |
| XLT   | xylitol                       | 1,4              | acidification (XyLITol)                                  |                               |              |
| MEL   | D-mélibiose                   | 1,32             | acidification (D-MELibiose)                              |                               |              |
|       |                               |                  |  | <u>NIT 1 + NIT 2 / 10 min</u> |              |
| NIT   | nitrate de potassium          | 0,08             | Réduction des NITrates en nitrites                       | incolore-rose pâle            | rouge        |
|       |                               |                  |  | <u>ZYM A + ZYM B / 10 min</u> |              |
| PAL   | β-naphthyl phosphate          | 0,0244           | Phosphatase ALcaline                                     | jaune                         | violet       |
|       |                               |                  |  | <u>VP 1 + VP 2 / 10 min</u>   |              |
| VP    | sodium pyruvate               | 1,904            | production d'acétyl méthyl-carbinol<br>(Voges Proskauer) | incolore-rose pâle            | violet-rose  |
| RAF   | D-raffinose                   | 1,56             | acidification (RAFfinose)                                |                               |              |
| XYL   | D-xylose                      | 1,4              | acidification (XYLose)                                   |                               |              |
| SAC   | D-saccharose                  | 1,32             | acidification (SACcharose)                               | rouge                         | jaune        |
| MDG   | méthyl-αD-<br>glucopyranoside | 1,28             | acidification (Méthyl-αD-<br>Glucopyranoside)            |                               |              |
| NAG   | N-acétyl-glucosamine          | 1,28             | acidification (N-Acétyl-Glucosamine)                     |                               |              |
| ADH   | L-arginine                    | 1,904            | Arginine DiHydrolase                                     | jaune                         | orange-rouge |
| URE   | urée                          | 0,76             | UREase   | jaune                         | rouge-violet |

-les tests d'identification doivent être lus comparativement au témoin négatif (0) et positif (GLU).

-les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de test positif. On doit alors les considérer comme négatifs.

3-Tableau 33 : Tableau de lecture du Système API 20 NE

| TESTS           | COMPOSANTS ACTIFS                  | QTE (mg/cup.) | REACTIONS/ENZYMES   | RESULTATS                     |                           |
|-----------------|------------------------------------|---------------|---|-------------------------------|---------------------------|
|                 |                                    |               |   | NEGATIF                       | POSITIF                   |
| NO <sub>3</sub> | potassium nitrate                  | 0,136         | réduction des Nitrates en nitrites                        | NIT 1 + NIT 2 / 5 min         |                           |
|                 |                                    |               | réduction des Nitrates en azote                           | incolore                      | rose-rouge                |
| TRP             | L-tryptophane                      | 0,2           | formation d'indole (TRyptophane)                          | Zn / 5 min                    |                           |
|                 |                                    |               |   | incolore                      | incolore                  |
| GLU             | D-glucose                          | 1,92          | fermentation (GLUcose)                                    | bleu à vert                   | jaune                     |
| ADH             | L-arginine                         | 1,92          | Arginine DiHydrolase                                      | jaune                         | orange / rose / rouge     |
| URE             | urée                               | 0,76          | UREase  | jaune                         | orange / rose / rouge     |
| ESC             | esculine citrate de fer            | 0,56<br>0,072 | hydrolyse (β-glucosidase) (ESCuline)                      | jaune                         | gris / marron / noir      |
| GEL             | gélatine (origine bovine)          | 0,6           | hydrolyse (protéase) (GELatine)                           | pas de diffusion du pigment   | diffusion du pigment noir |
| PNPG            | 4-nitrophényl-βD-galactopyranoside | 0,22          | β-galactosidase (Para-NitroPhényl-βD-Galactopyranosidase) | incolore                      | jaune                     |
| GLU             | D-glucose                          | 1,56          | assimilation (GLUcose)                                    | transparence                  | trouble                   |
| ARA             | L-arabinose                        | 1,4           | assimilation (ARAbinose)                                  | transparence                  | trouble                   |
| MNE             | D-mannose                          | 1,4           | assimilation (ManNosE)                                    | transparence                  | trouble                   |
| MAN             | D-mannitol                         | 1,36          | assimilation (MANnitol)                                   | transparence                  | trouble                   |
| NAG             | N-acétyl-glucosamine               | 1,28          | assimilation (N-Acétyl-Glucosamine)                       | transparence                  | trouble                   |
| MAL             | D-maltose                          | 1,4           | assimilation (MALtose)                                    | transparence                  | trouble                   |
| GNT             | potassium gluconate                | 1,84          | assimilation (potassium GlucoNaTe)                        | transparence                  | trouble                   |
| CAP             | acide caprique                     | 0,78          | assimilation (acide CAPrique)                             | transparence                  | trouble                   |
| ADI             | acide adipique                     | 1,12          | assimilation (acide ADIpique)                             | transparence                  | trouble                   |
| MLT             | acide malique                      | 1,56          | assimilation (MaLaTe)                                     | transparence                  | trouble                   |
| CIT             | trisodium citrate                  | 2,28          | assimilation (trisodium CITrate)                          | transparence                  | trouble                   |
| PAC             | acide phénylacétique               | 0,8           | assimilation (acide PhénylACétique)                       | transparence                  | trouble                   |
| OX              | (voir notice du test oxydase)      | -             | cytochrome-oxydase  | (voir notice du test oxydase) |                           |

-les tests d'identification doivent être lus comparativement au témoin négatif (0) et positif (GLU).

-les tests MNE et XLT peuvent être oranges, lorsqu'ils sont entourés ou précédés de test positif. On doit alors les considérer comme négatifs.

## ANNEXE 3 : Composition des Réactifs

### 1- Composition des réactifs utilisés lors de la lecture du système API 20E

#### -Réactifs utilisés : [91]

##### Réactif VP1 :

-Hydroxyde de potassium.....40g

-H<sub>2</sub>O.....100ml

##### Réactif VP2 :

- $\alpha$ -naphtol.....6g

-Ethanol.....100ml

##### Réactif NIT1 :

-Acide sulfanilique.....0,4g

-Acide acétique.....30g

- H<sub>2</sub>O.....70ml

##### Réactif NIT2 : -N,N-diméthyl-1-naphtylamine..0,6g

- Acide acétique.....30g

-H<sub>2</sub>O.....70ml

### 2- composition du milieu API Staph :

|                                      |                          |             |
|--------------------------------------|--------------------------|-------------|
| <b>API Staph<br/>Medium<br/>6 ml</b> | Extrait de levure        | 0,5 g       |
|                                      | Bactopeptone             |             |
|                                      | (origine bovine/porcine) | 10 g        |
|                                      | NaCl                     | 5 g         |
|                                      | Oligoéléments            | 10 ml       |
|                                      | Eau déminéralisée        | qap 1000 ml |
| pH : 7,0 - 7,4                       |                          |             |

### 3-Propriétés physiques des solvants organiques utilisés : [100]

**Tableau 34 :** Propriétés physiques des solvants organiques utilisés :

| Propriétés physiques<br>Solvants | Ebullition<br>(°C) | Densité      | Polarité   |
|----------------------------------|--------------------|--------------|------------|
| <b>n-Hexane</b>                  | <b>69</b>          | <b>0.659</b> | <b>0.1</b> |
| <b>Dichloromethane</b>           | <b>40</b>          | <b>1.325</b> | <b>3.1</b> |
| <b>Acetate d'ethyle</b>          | <b>77</b>          | <b>0.901</b> | <b>4.4</b> |
| <b>n-Butanol</b>                 | <b>118</b>         | <b>0.810</b> | <b>--</b>  |
| <b>Méthanol</b>                  | <b>65</b>          | <b>0.796</b> | <b>5.1</b> |

# Annexe 4 : Planches



Fig.1: aspect macroscopique de la souche S1 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2: aspect macroscopique de la souche S1 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S1 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4: aspect macroscopique de la souche S1 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S1 sur milieu ISP2 (Recto)

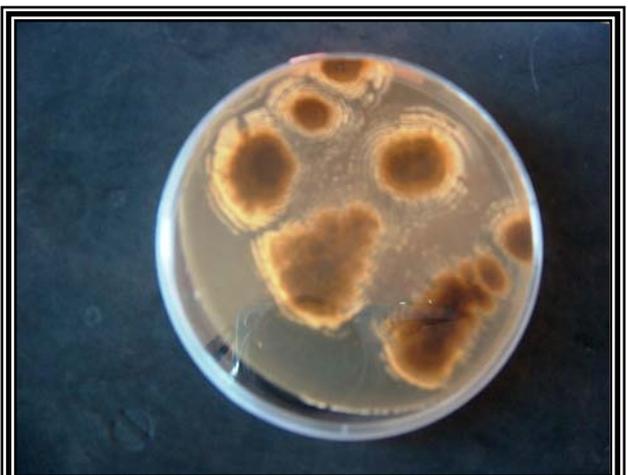


Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S1 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°1** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S1 sur milieu ISP2.

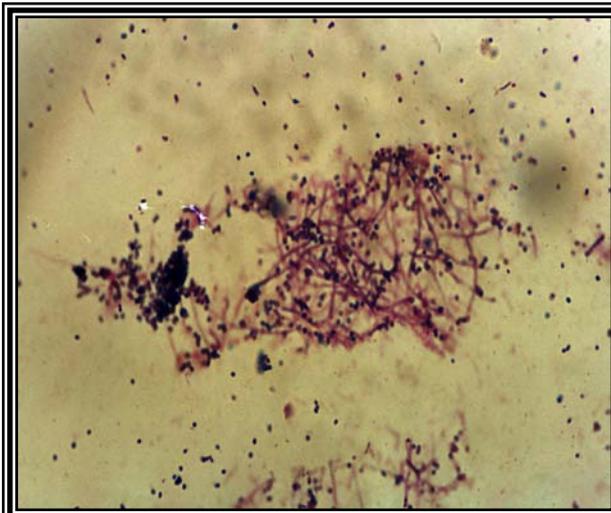


Fig.1: aspect microscopique de la souche S1  
G×100

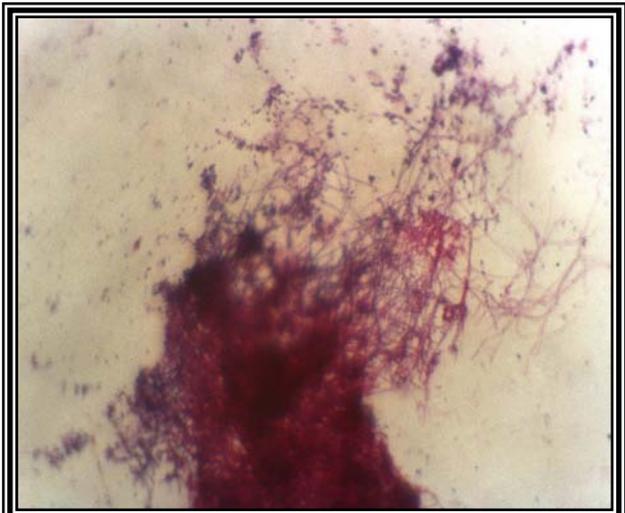


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S1  
G×100



Fig.3 : aspect microscopique de la souche S1  
G×100

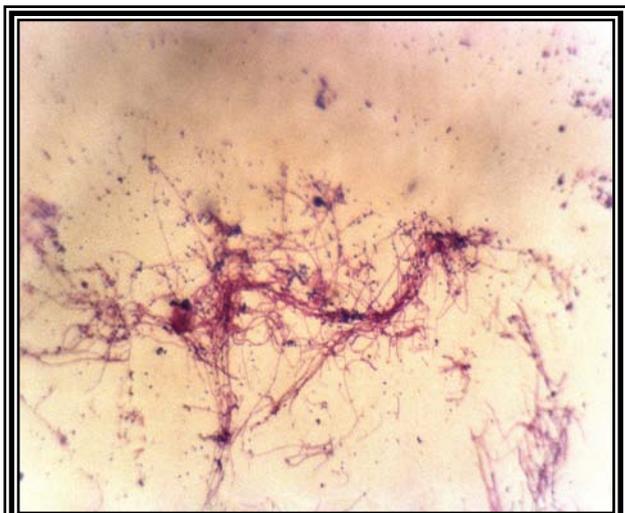


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S1  
G×100

**Planche n°2** : Examen microscopique de la souche S1 G×100 (microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S2 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S2 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3: aspect macroscopique de la souche S2 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S2 sur milieu ISP2 (Verso)

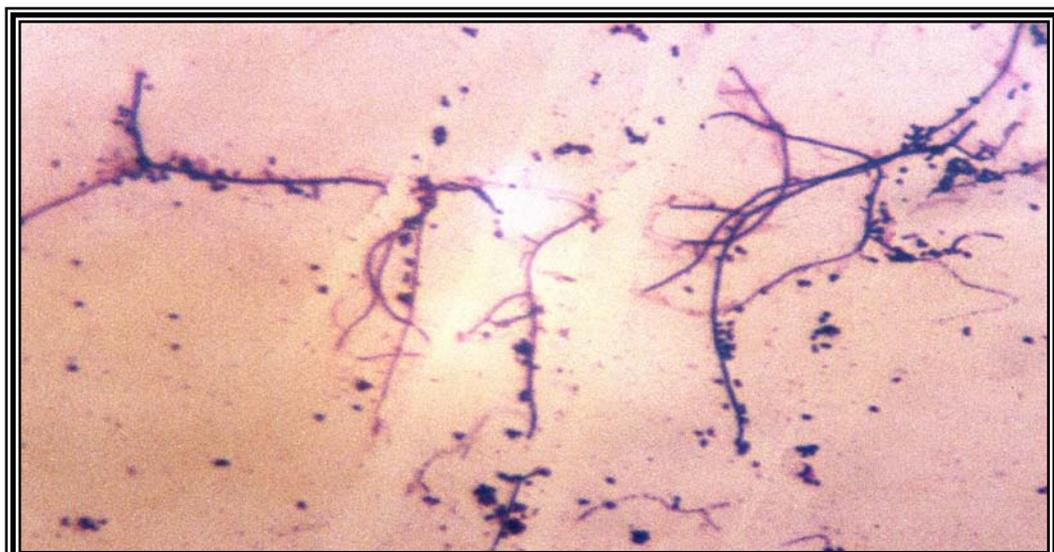


Fig.5: aspect microscopique de la souche S2 G×100 (microscope optique)

**Planche n°3** : Aspect macroscopique et microscopique de la souche n°2.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S3 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2: aspect macroscopique de la souche S3 sur milieu ISP2 (Verso)

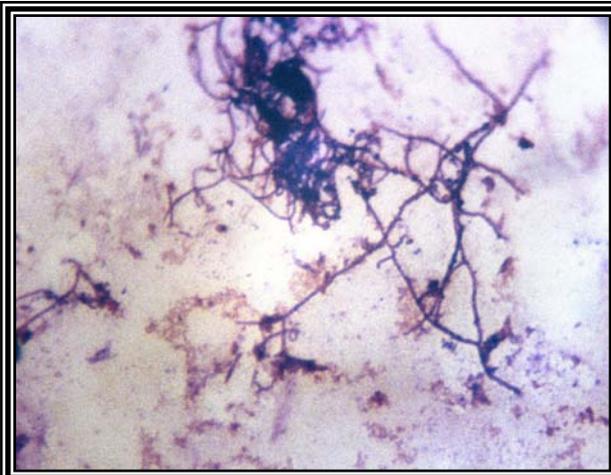


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S3 G×100

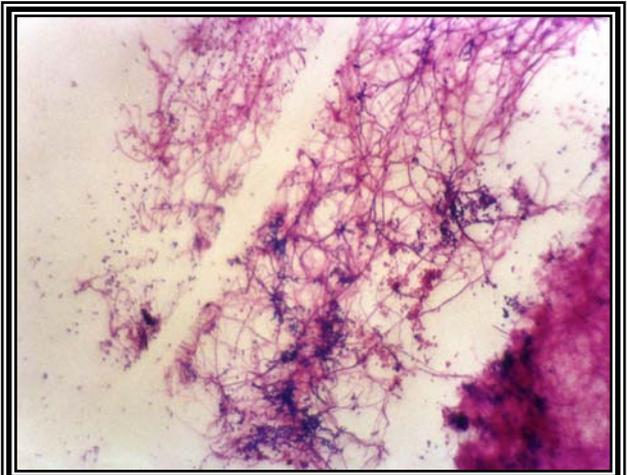


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S3 G×100

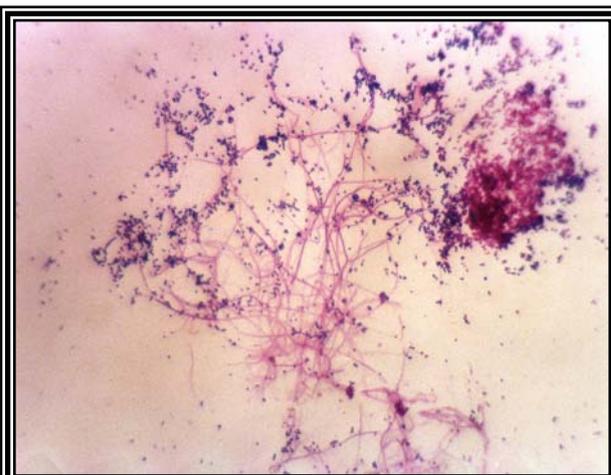


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S3 G×100

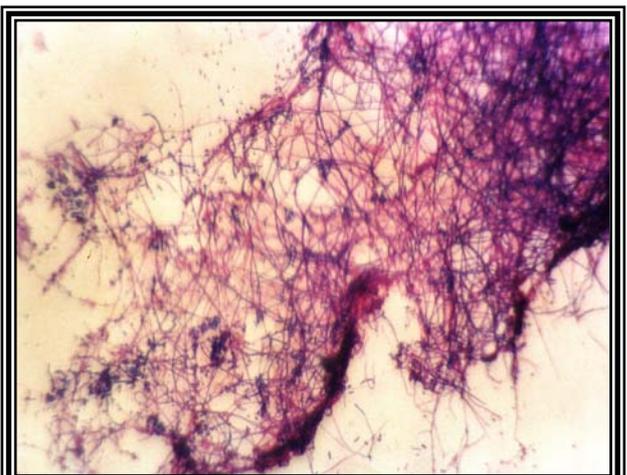


Fig.6: aspect microscopique de la souche S3 G×100

**Planches n°4** : Aspect macroscopique et microscopique de la souche S3.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S5 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S5 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S5 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S5 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S5 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S5 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°5** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S5.

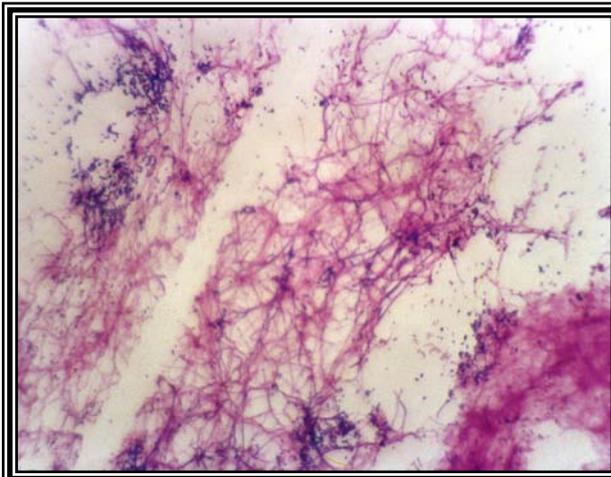


Fig.1 : aspect microscopique de la souche S5  
G×100

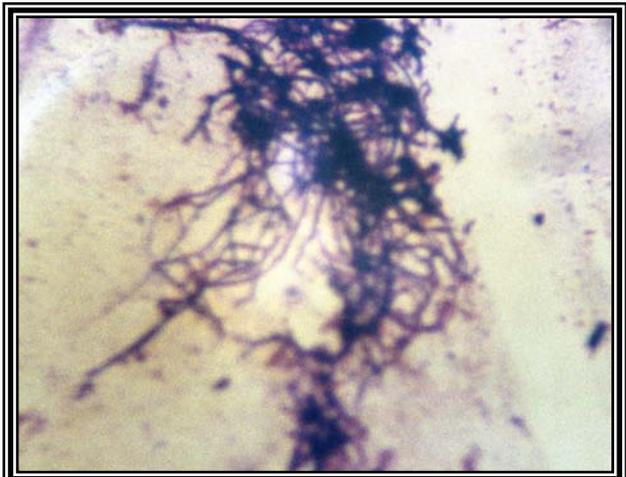


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S5  
G×100

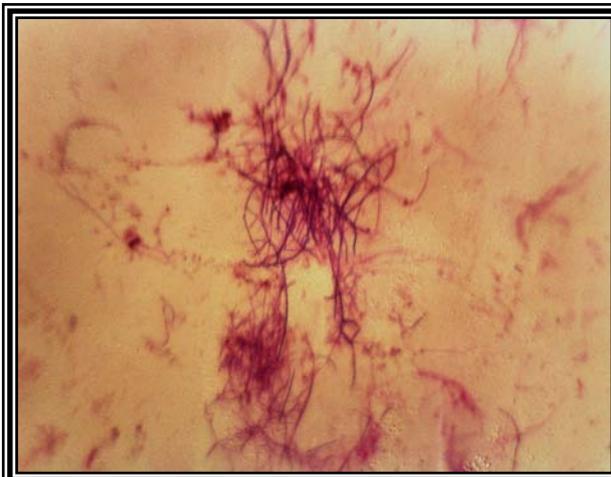


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S5  
G×100

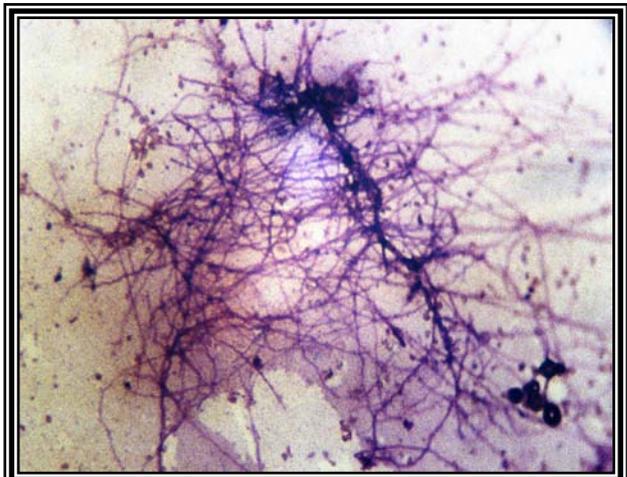


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S5  
G×100

**Planche n°6** : Aspect microscopique de la souche S5 G×100 (microscope optique).



Fig.1: aspect macroscopique de la souche S6 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S6 sur milieu ISP2 (Verso)

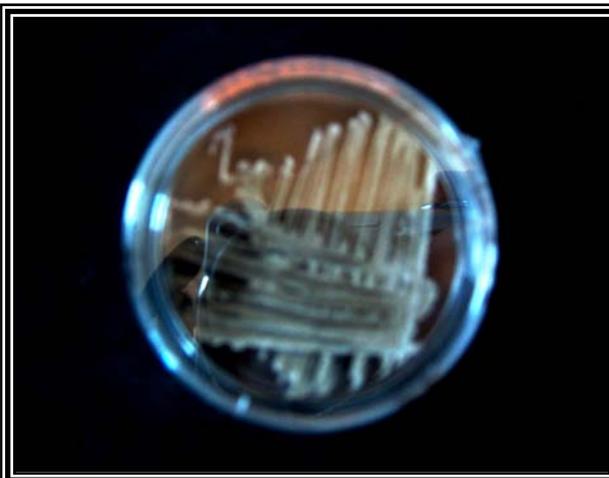


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S6 sur milieu ISP2 (Recto)

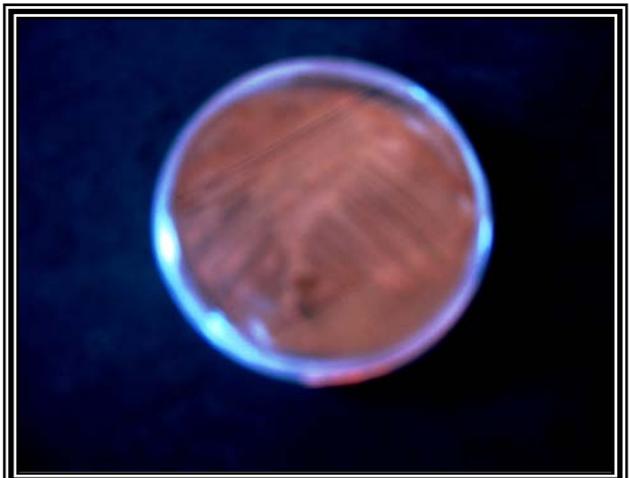


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S6 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S6 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S6 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planches n°7** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S6.

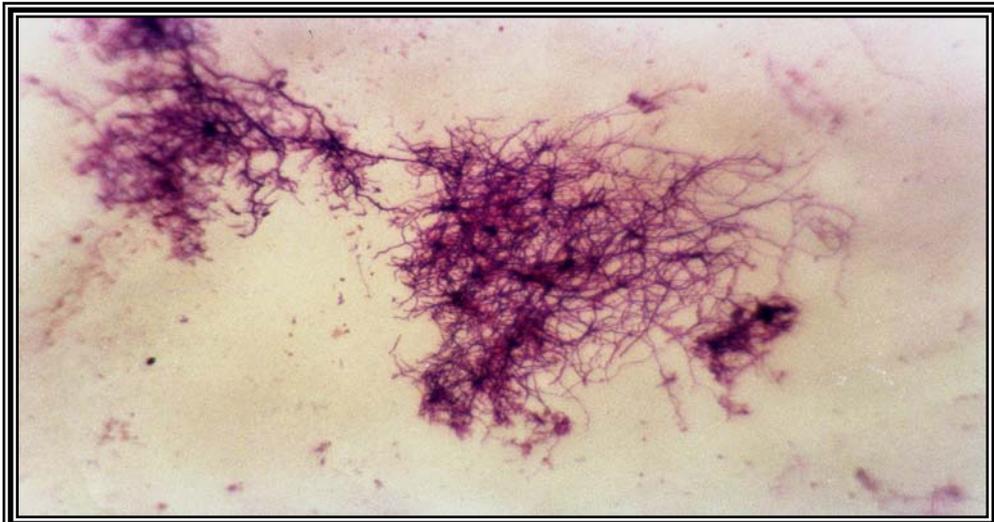


Fig.1: aspect microscopique de la souche S6 G×100



Fig.2 : aspect microscopique de la souche S6 G×100

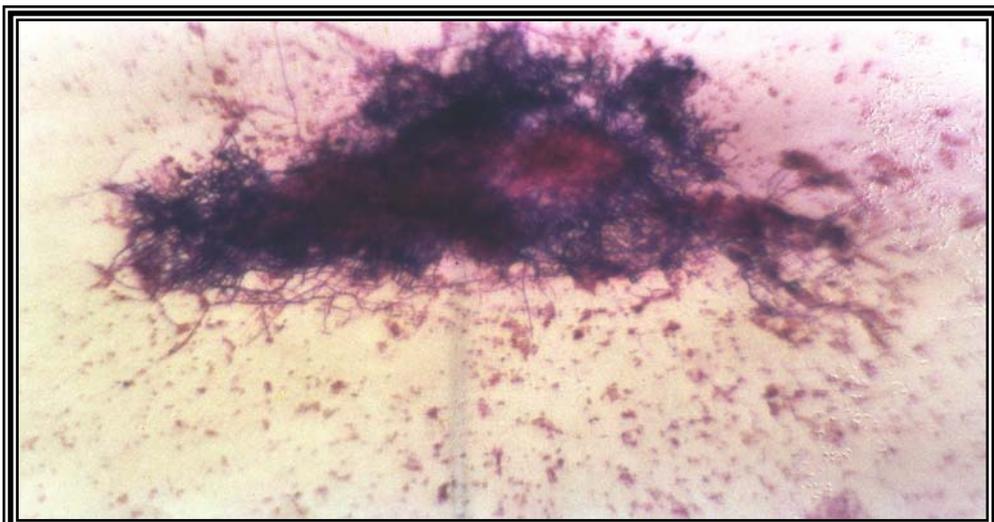


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S6 G×100

**Planche n° 8** : Aspect microscopique de la souche S6 G×100 (microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S8 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S8 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S8 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S8 sur milieu ISP2 (Verso)

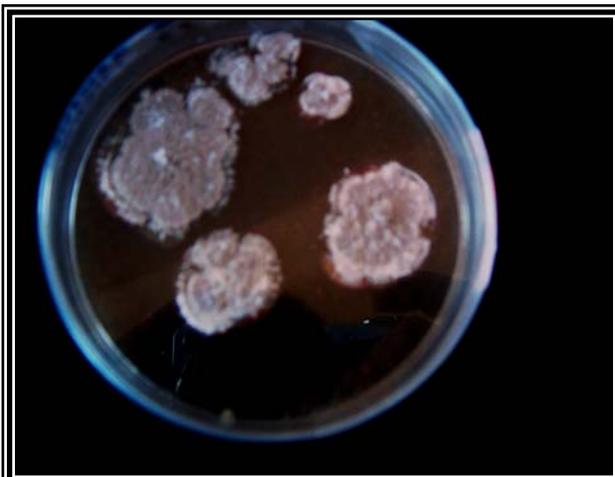


Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S8 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S8 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n° 9** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S8.

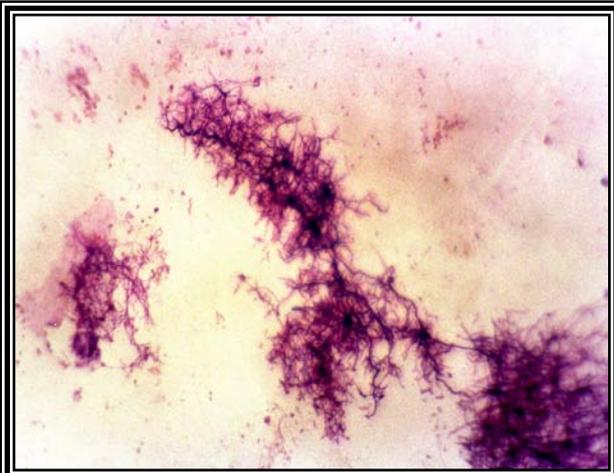


Fig.1: aspect microscopique de la souche S8  
G×100

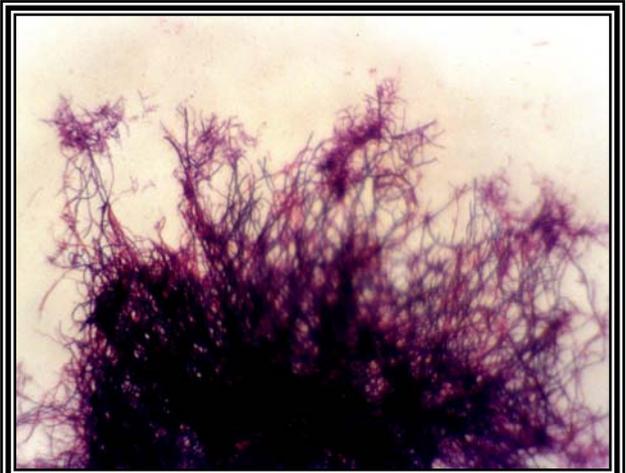


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S8  
G×100

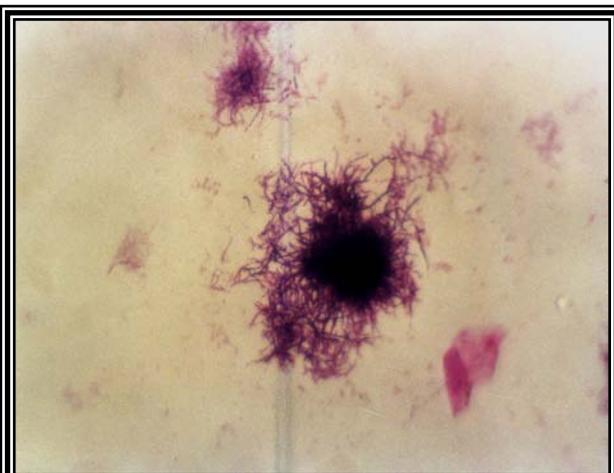


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S8  
G×100



Fig.4 : aspect microscopique de la souche S8  
G×100

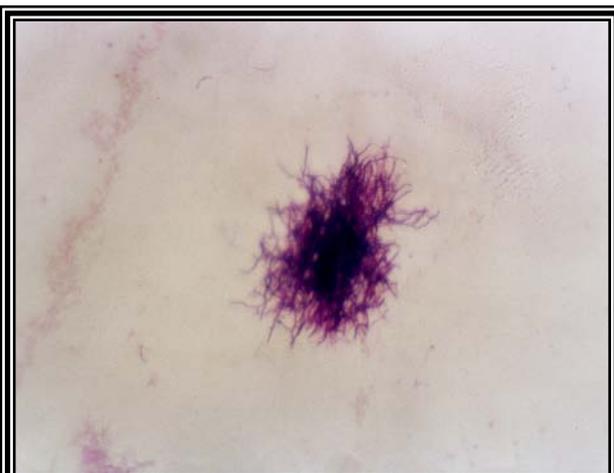


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S8  
G×100

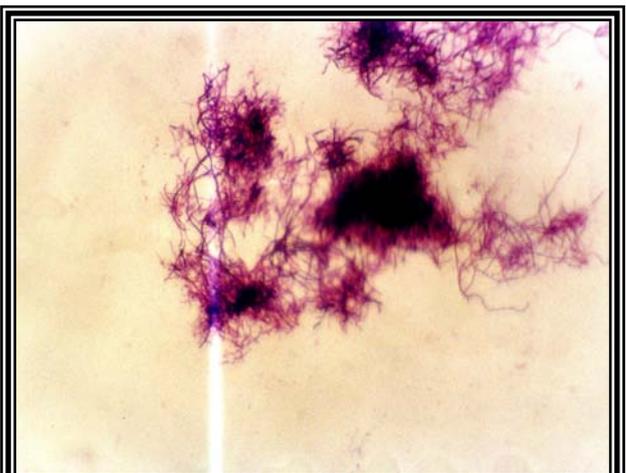


Fig.6: aspect microscopique de la souche S8  
G×100

**Planche 10** : Aspect microscopique de la souche S8 G×100 (microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S9 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S9 sur milieu ISP2 (Verso)

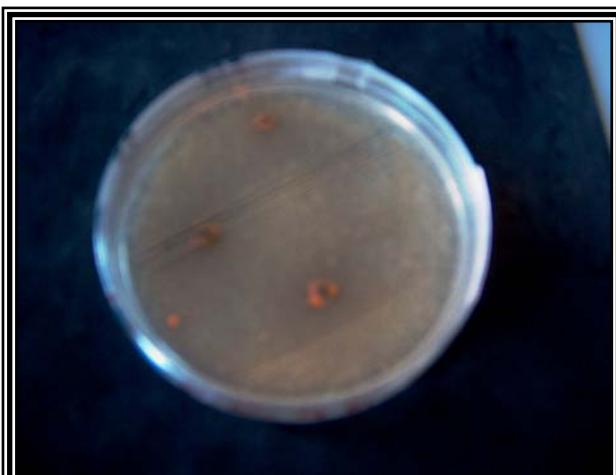


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S9 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S9 sur milieu ISP2 (Verso)

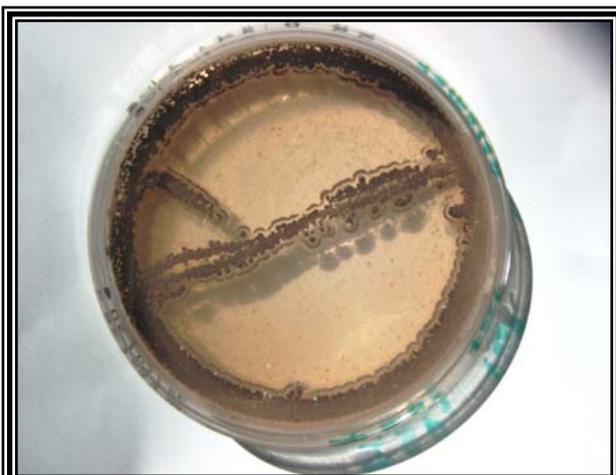


Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S9 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S9 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°11** : Aspect macroscopique des colonies de la souche n°9 Sur milieu ISP2.

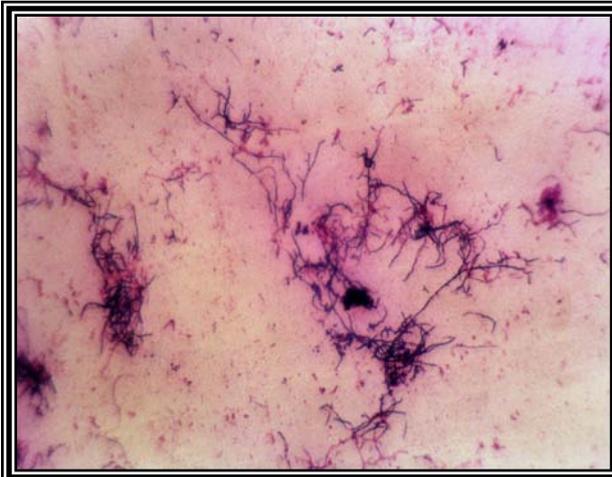


Fig.1 : aspect microscopique de la souche S9  
G×100



Fig.2 : aspect microscopique de la souche S9  
G×100

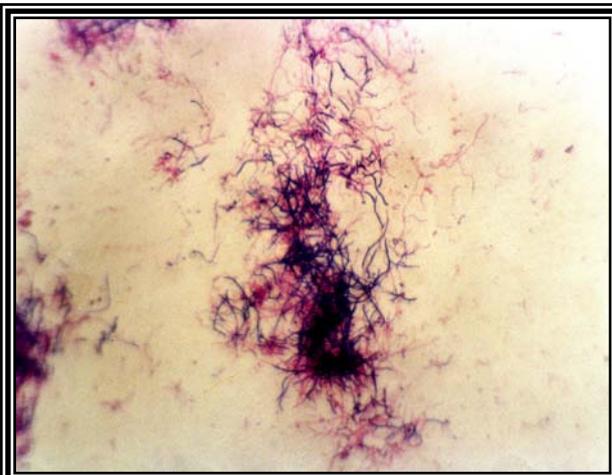


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S9  
G×100

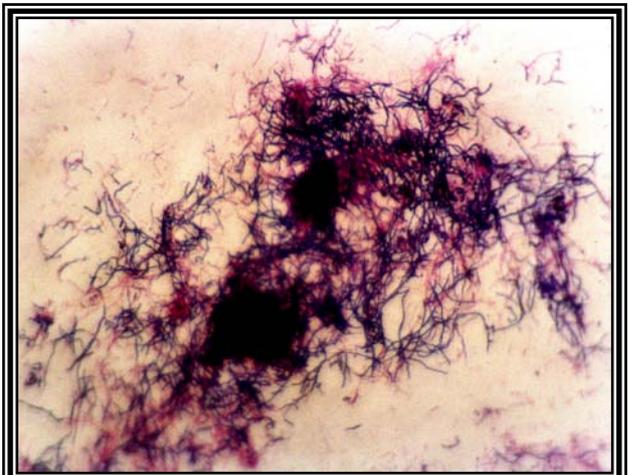


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S9  
G×100

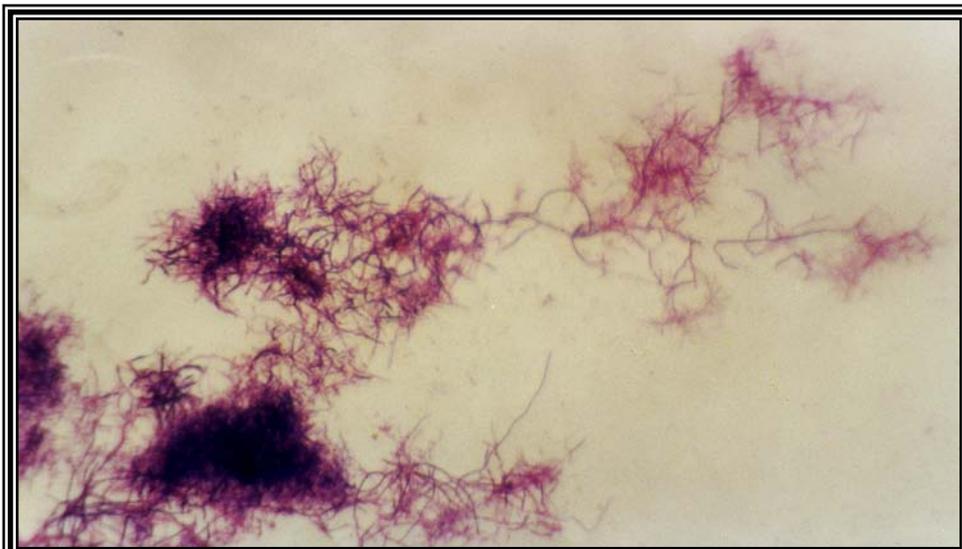


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S9 G×100

**Planche n°12** : Aspect microscopique de la souche S9 G×100 ( Microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S10 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S10 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S10 sur milieu ISP2 (Recto)

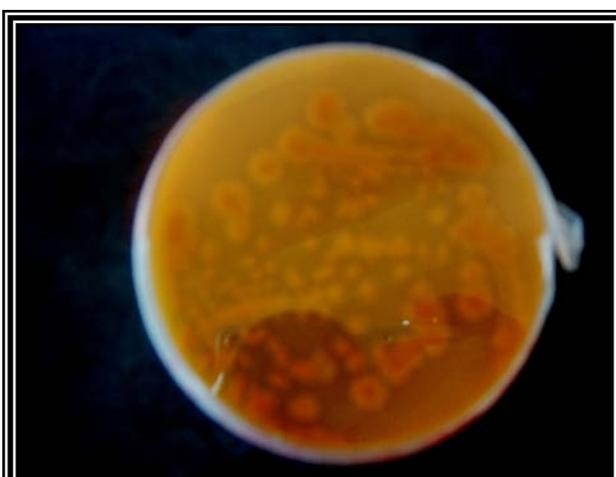


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S10 sur milieu ISP2 (Verso)

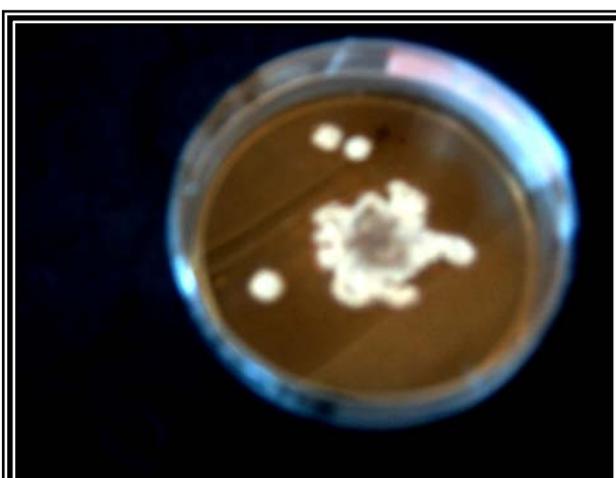


Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S10 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S10 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°13** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S10 sur milieu ISP2.

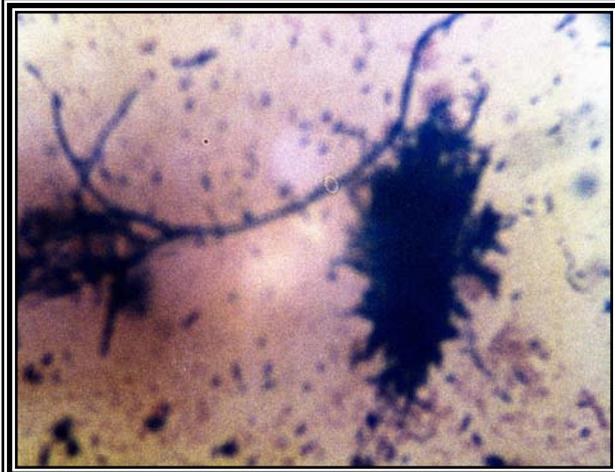


Fig.1 : aspect microscopique de la souche S10  
G×100

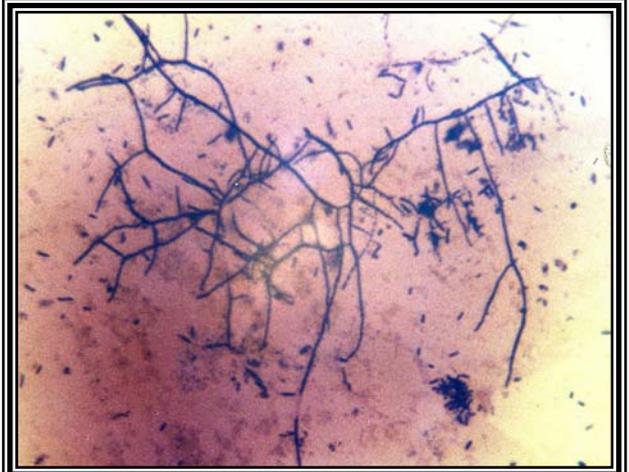


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S10  
G×100

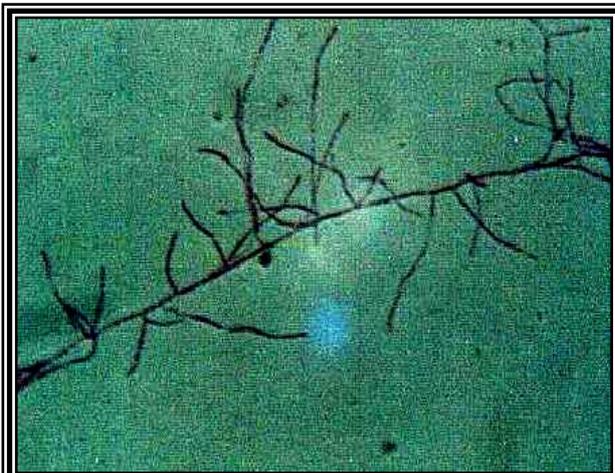


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S10  
G×100

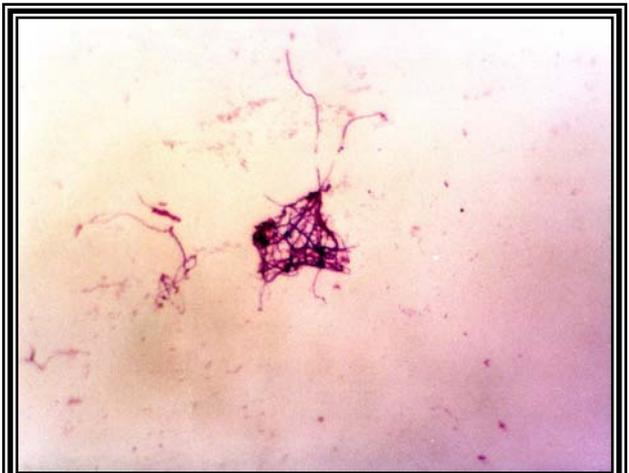


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S10  
G×100

**Planche n° 14** : Aspect microscopique de la souche S10 G×100 (Microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S11 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S11 sur milieu ISP2 (Verso)

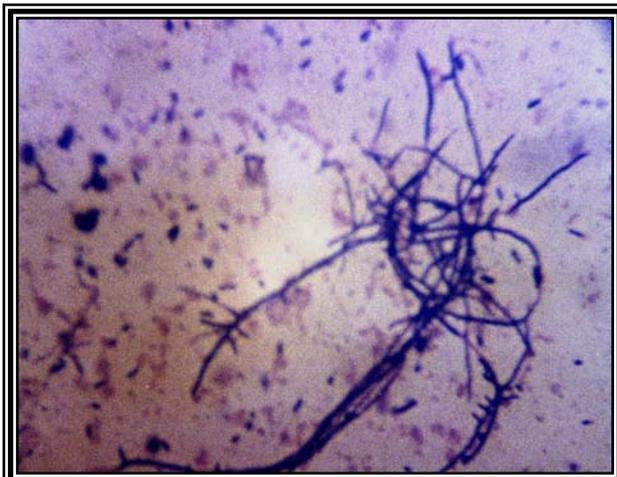


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S11  
G×100

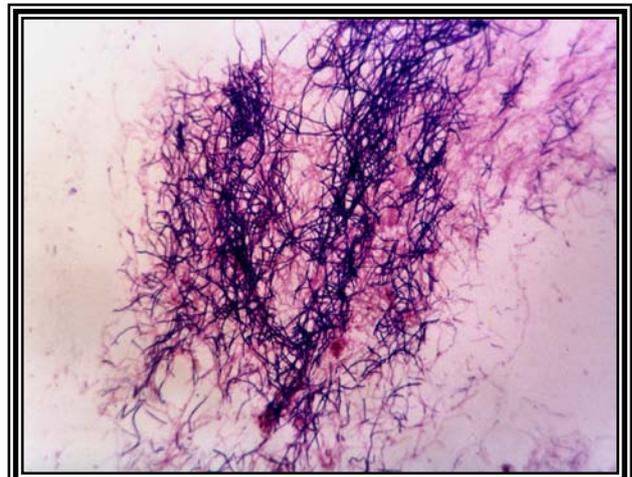


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S11  
G×100

**Planche n°15** : Aspect macroscopique et microscopique de la souche S11.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S12 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S12 sur milieu ISP2 (Verso)

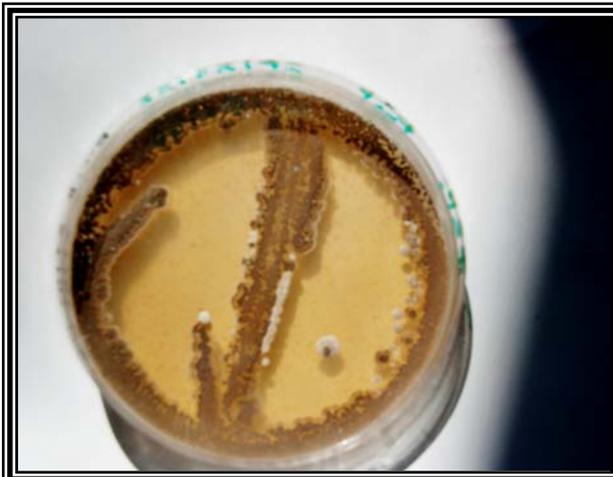


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S12 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S12 sur milieu ISP2 (Verso)

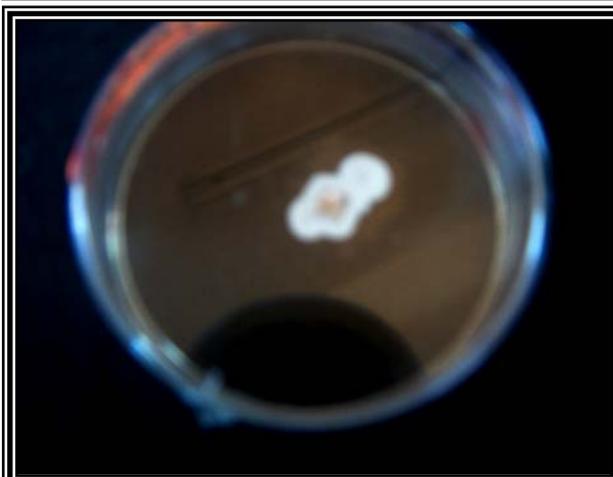


Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S12 sur milieu ISP2 (Recto)

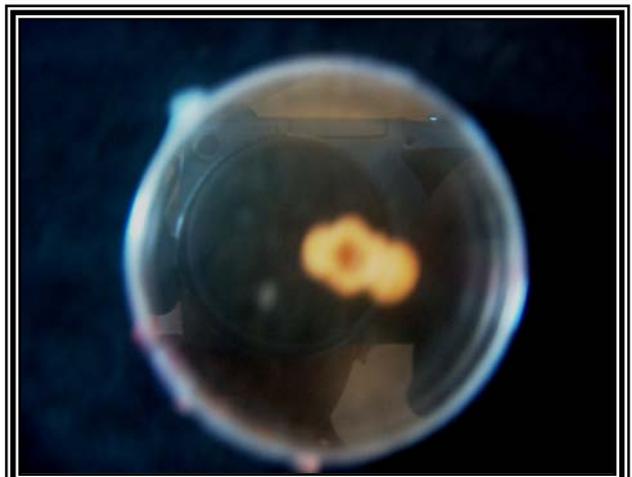


Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S12 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°16** : Aspect macroscopique des colonies de la souche 12 sur milieu ISP2.



Fig.1 : aspect microscopique de la souche S12  
G×100



Fig.2: aspect microscopique de la souche S12  
G×100



Fig.3 : aspect microscopique de la souche S12  
G×100

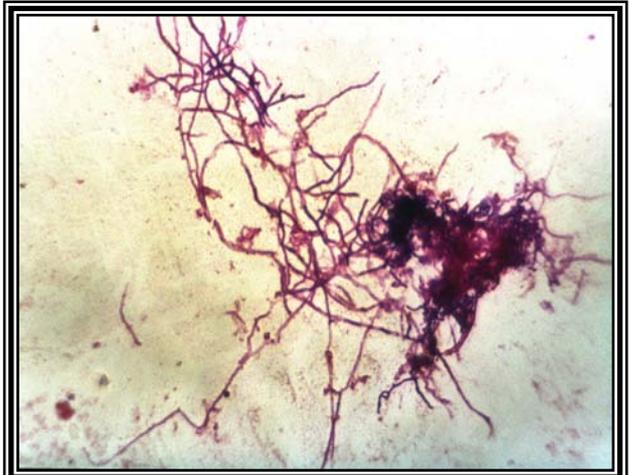


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S12  
G×100

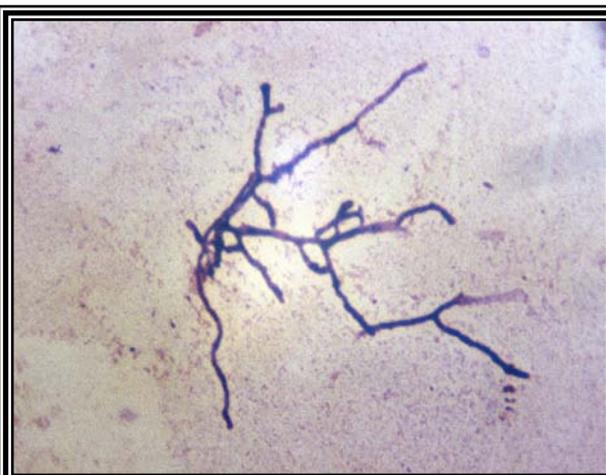


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S12  
G×100

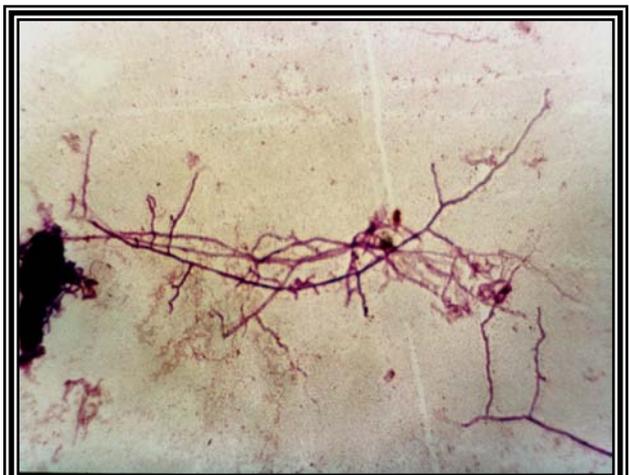


Fig.6: aspect microscopique de la souche S12  
G×100

**Planche n°17** : Aspect microscopique de la souche S12 G×100(microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S13 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S13 sur milieu ISP2 (Verso)

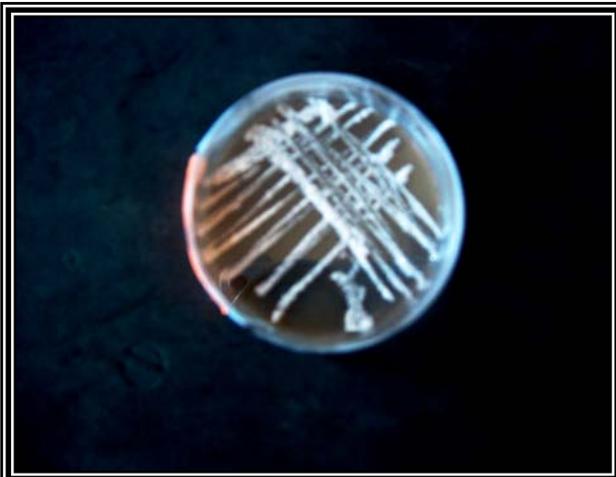


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S13 sur milieu ISP2 (Recto)

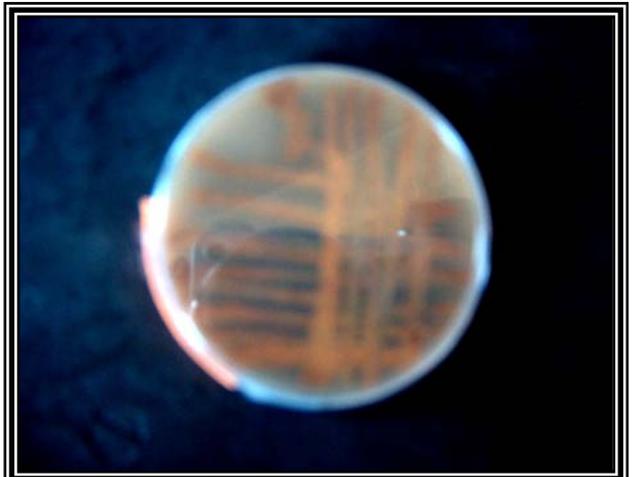


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S13 sur milieu ISP2 (Verso)

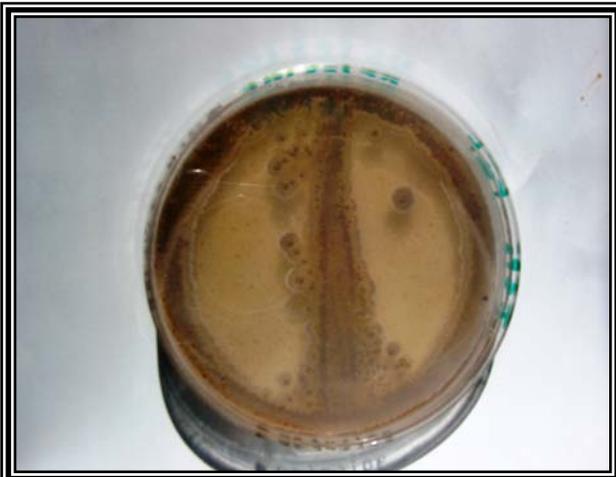


Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S13 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S13 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°18** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S13 Sur milieu ISP2.

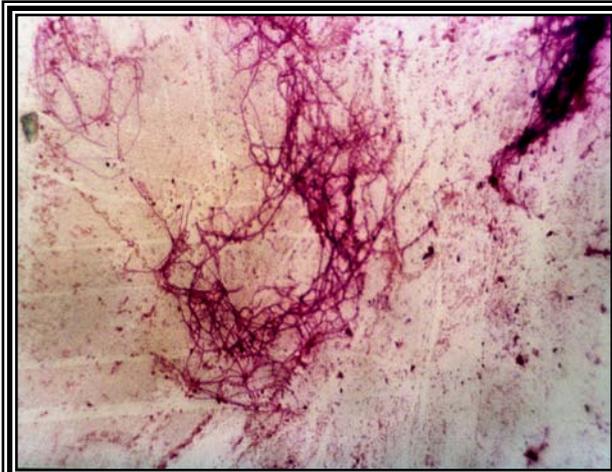


Fig.1 : aspect microscopique de la souche S13  
G×100

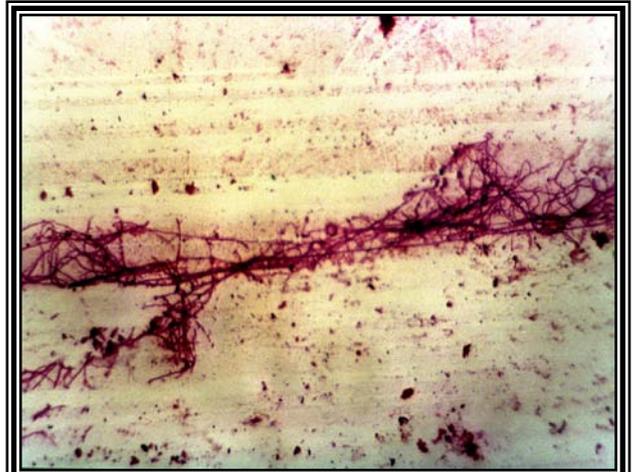


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S13  
G×100

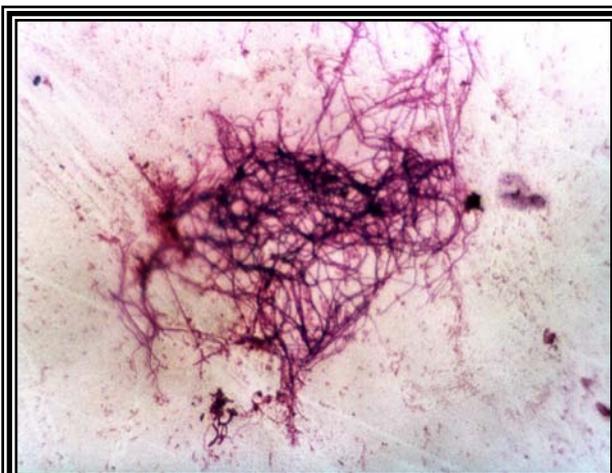


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S13  
G×100

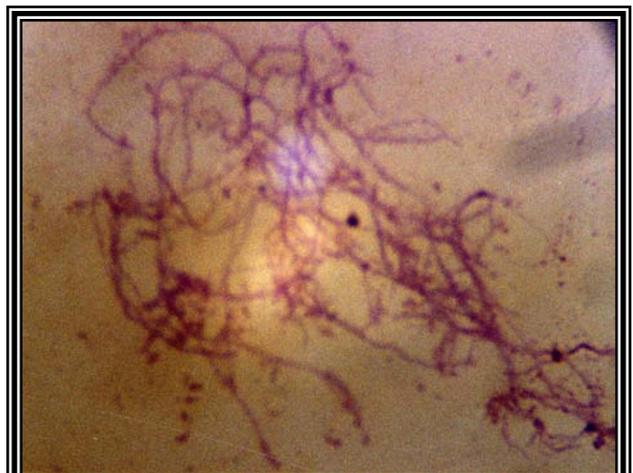


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S13  
G×100

**Planche n° 19** : Aspect microscopique de la souche S13 G×100 (microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S15 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S15 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect microscopique de la souche S15  
G×100

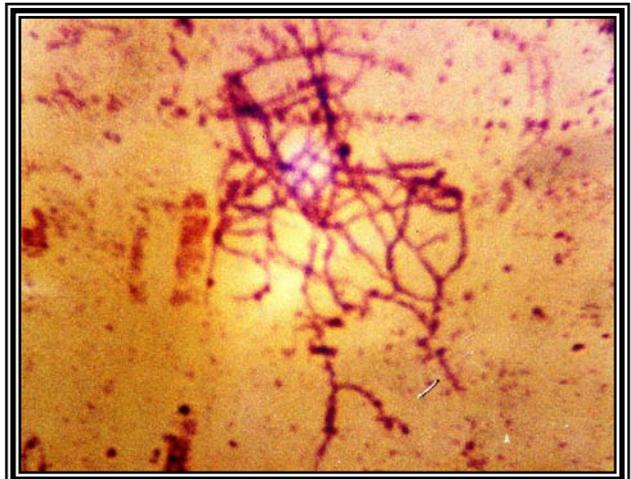


Fig.4 : aspect microscopique de la souche S15  
G×100

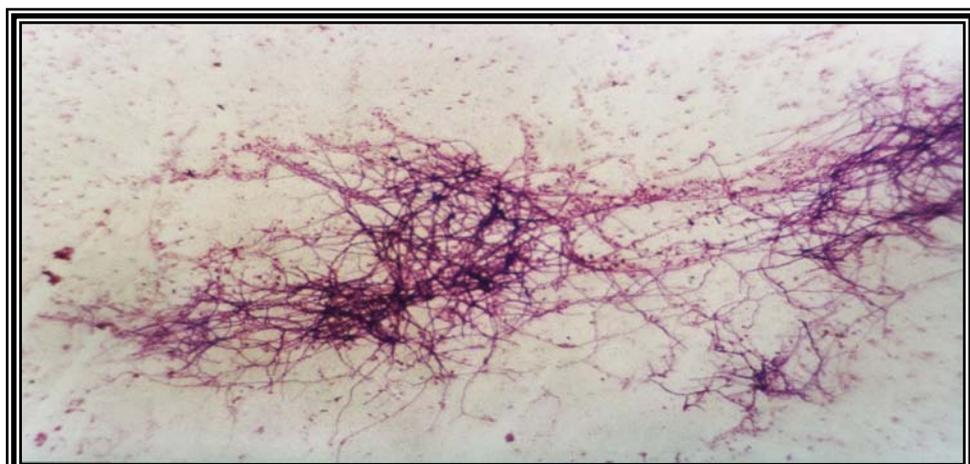


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S15 G×100

**Planche n°20:** Aspect macroscopique et microscopique de la souche S15.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S16  
Sur le milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S16  
Sur le milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S16  
Sur le milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S16  
Sur le milieu ISP2 (Verso)

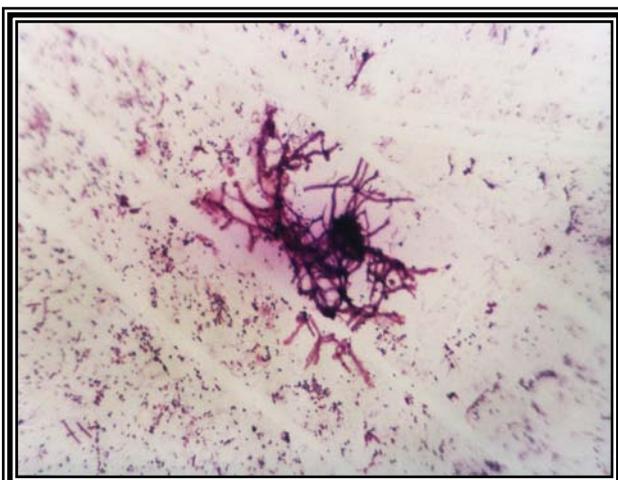


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S16  
G×100

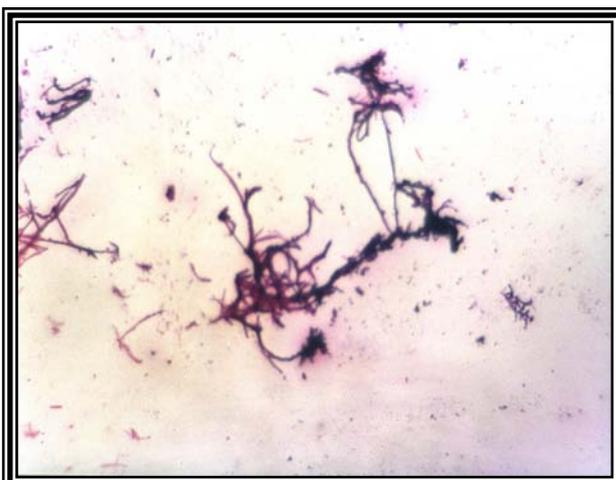


Fig.6 : aspect microscopique de la souche S16  
G×100

**Planche n° 21** : Aspect macroscopique et microscopique de la souche S16.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S17  
Sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S17  
ur milieu ISP2 (Verso)

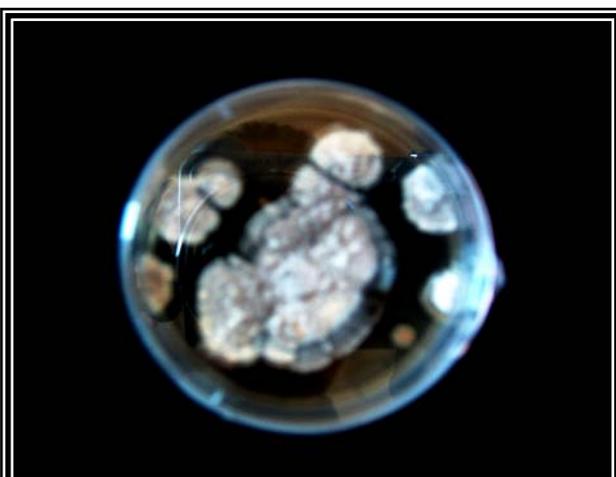


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S17  
Sur milieu ISP2 (Recto)

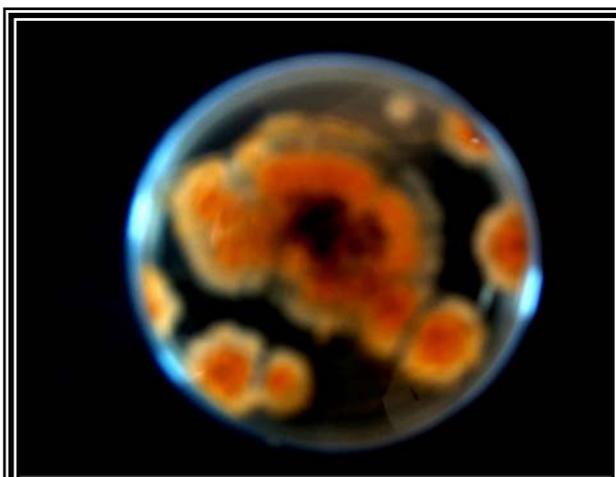


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S17  
Sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S17  
Sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S17  
Sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°22** : Aspect macroscopique des colonies de la Souche S17 Sur milieu ISP2.

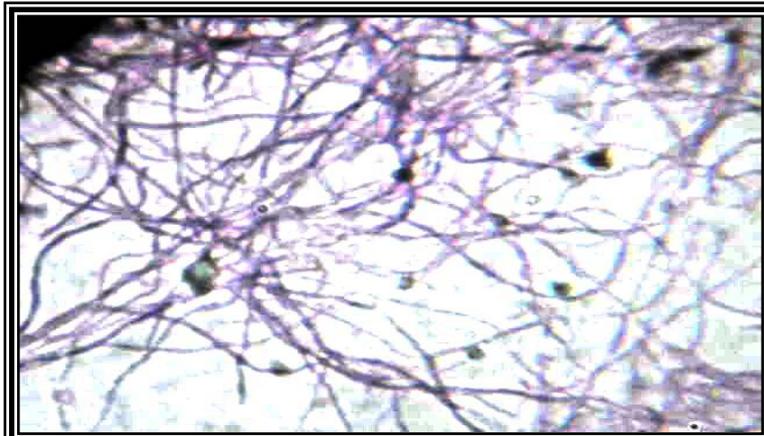


Fig.1: aspect microscopique de la souche S17 G×100

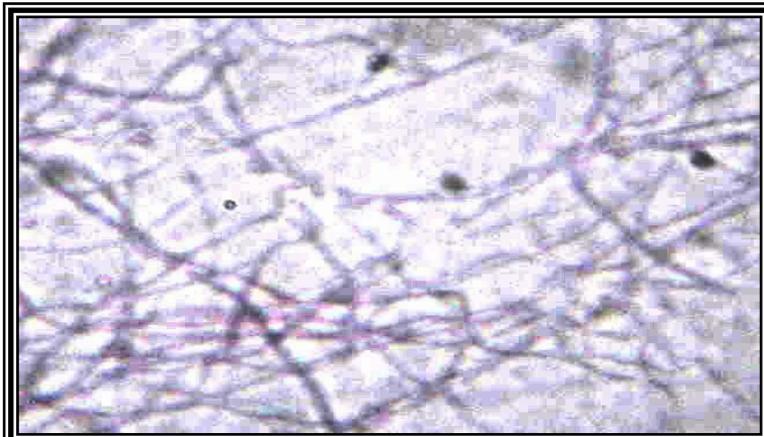


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S17 G×100

**Planche n°23** : Aspect microscopique de la Souche S17 G×100 (microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S18 sur milieu ISP2 (Recto)

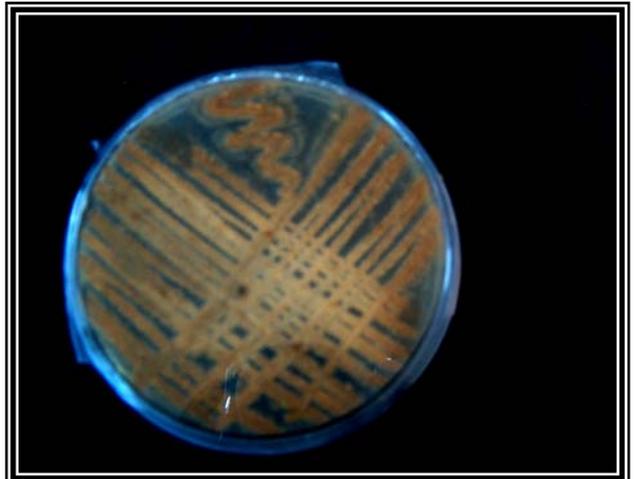


Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S18 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S18 sur milieu ISP2 (Recto)

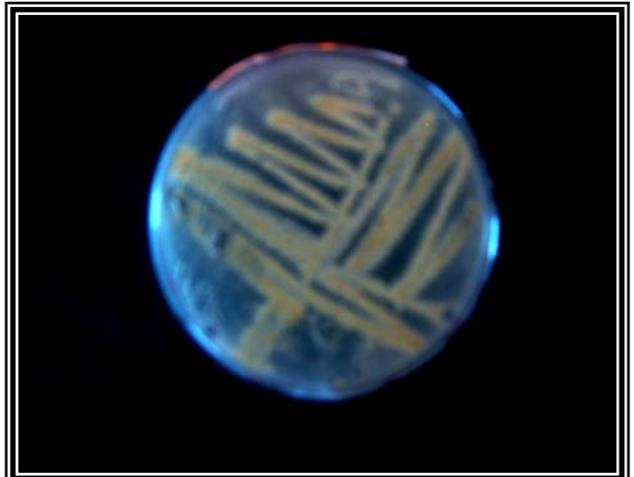


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S18 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S18 sur milieu ISP2 (Recto)

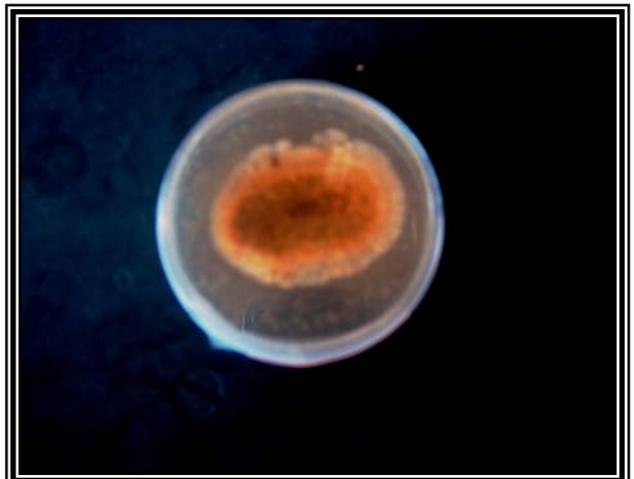


Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S18 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°24** : Aspect macroscopique des colonies de la souche S 18 sur le milieu ISP2.

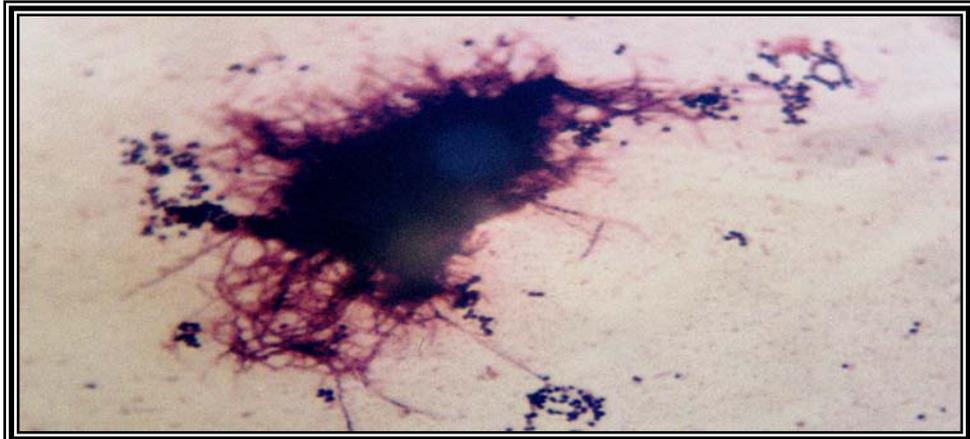


Fig.1 : aspect microscopique de la souche S18 G×100

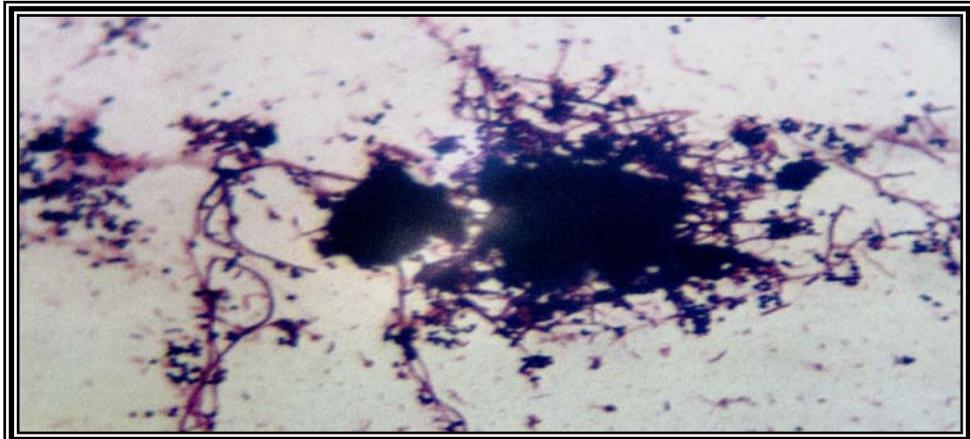


Fig.2 : aspect microscopique de la souche S18 G×100

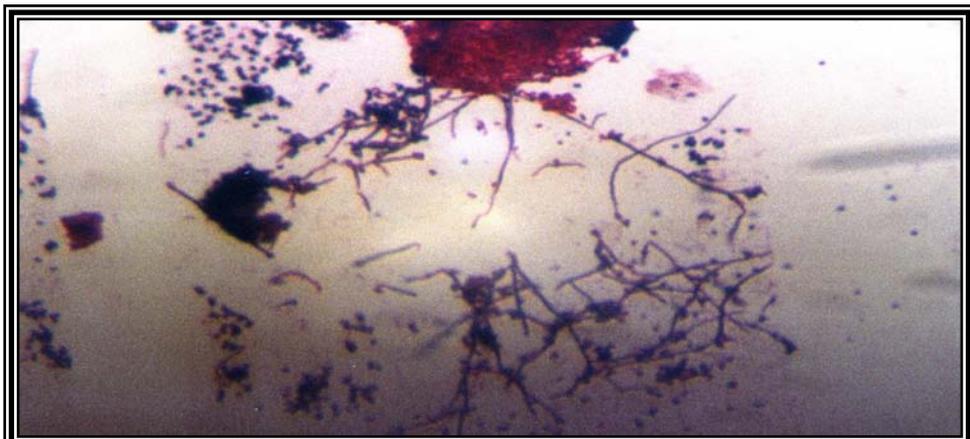


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S18 G×100

**Planche n°25** : Aspect microscopique de la Souche 18 G×100(microscope optique).

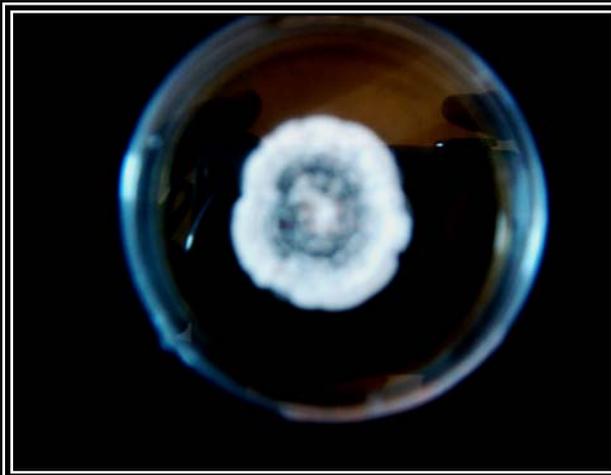


Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S23 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2: aspect macroscopique de la souche S23 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S23 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S23 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S23 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6: aspect macroscopique de la souche S23 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°26** : Aspect macroscopique des colonies de la Souche S23 sur le milieu ISP2.

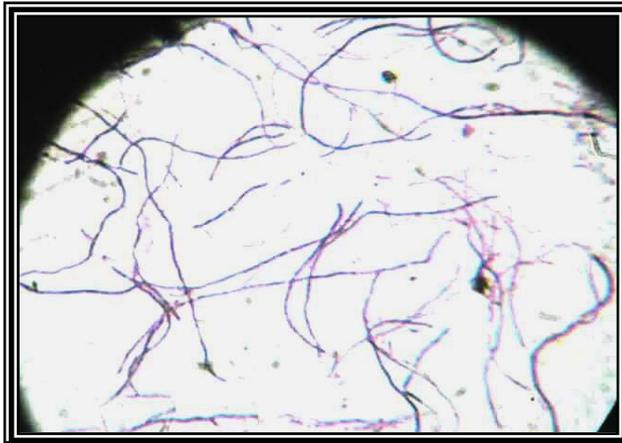


Fig.1 : aspect microscopique de la souche  
S23 G×100



Fig.2: aspect microscopique de la souche  
S23G×100

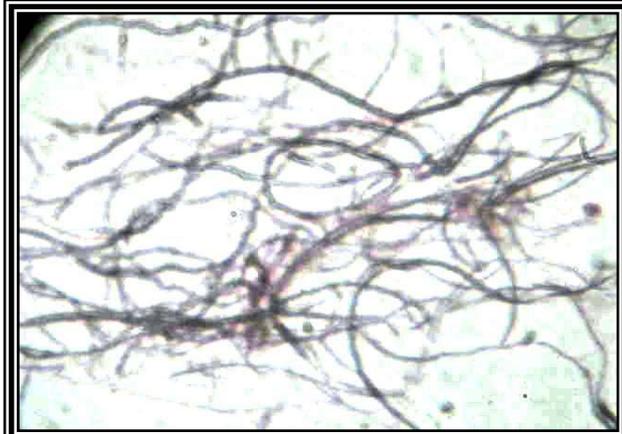


Fig.3: aspect microscopique de la souche  
S23 G×100

**Planche n°27** : Aspect microscopique de la Souche S23 G×100 (microscope optique).

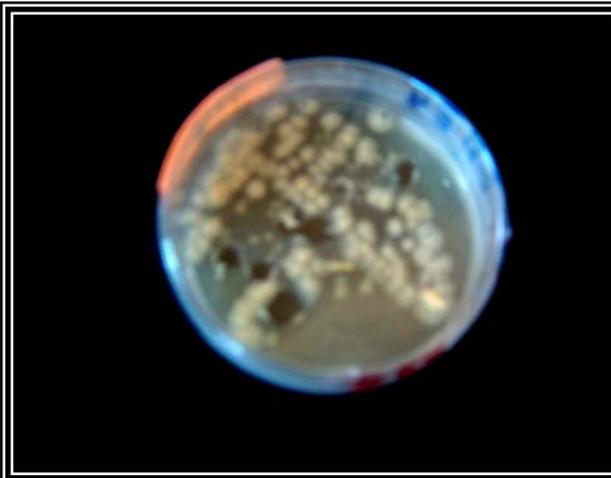


Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S24 sur milieu ISP2 (Recto)

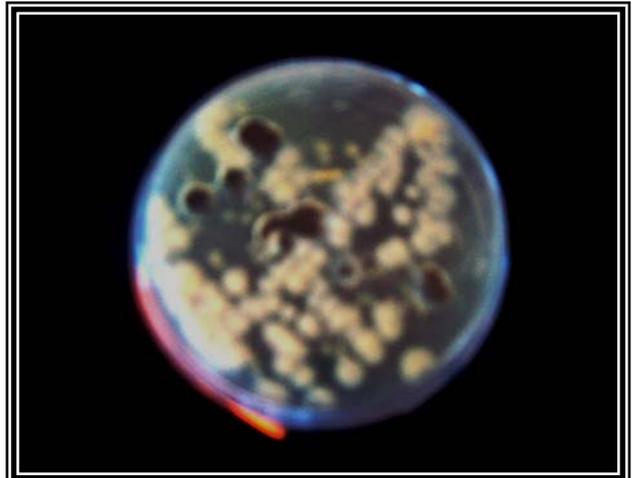


Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S24 sur milieu ISP2 (Verso)

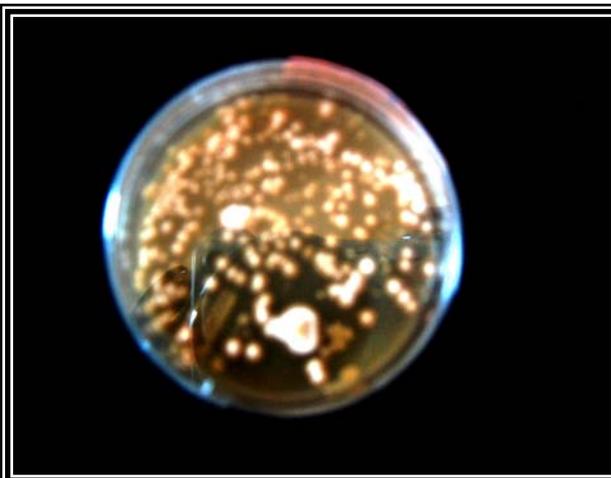


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S24 sur milieu ISP2 (Recto)

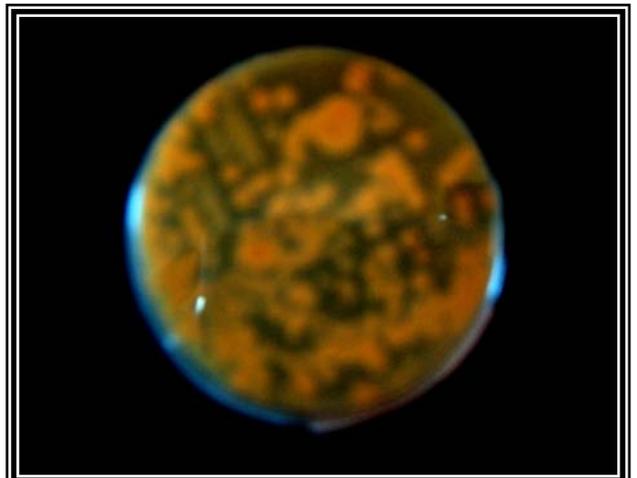


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S24 sur milieu ISP2 (Verso)

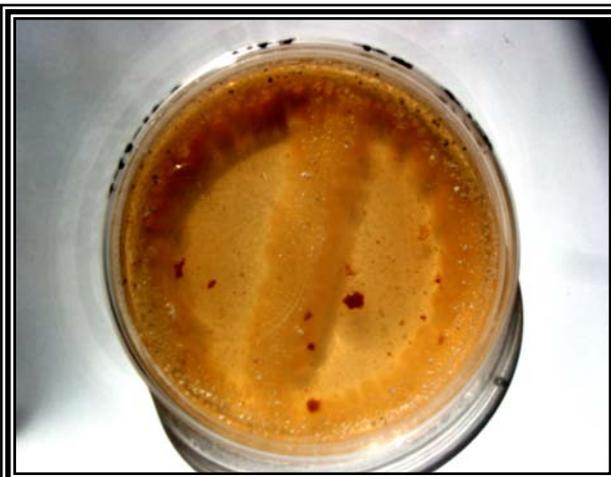


Fig.5 : aspect macroscopique de la souche S24 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.6 : aspect macroscopique de la souche S24 sur milieu ISP2 (Verso)

**Planche n°28** : Aspect macroscopique des colonies de la souche 24 sur milieu ISP2

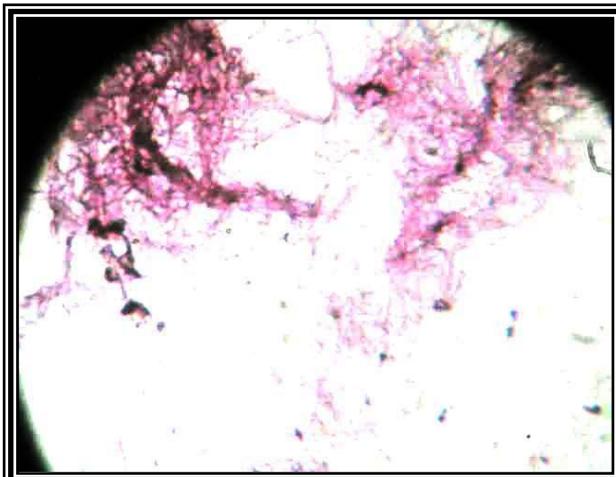


Fig.1 : aspect microscopique de la souche S24  
G×100

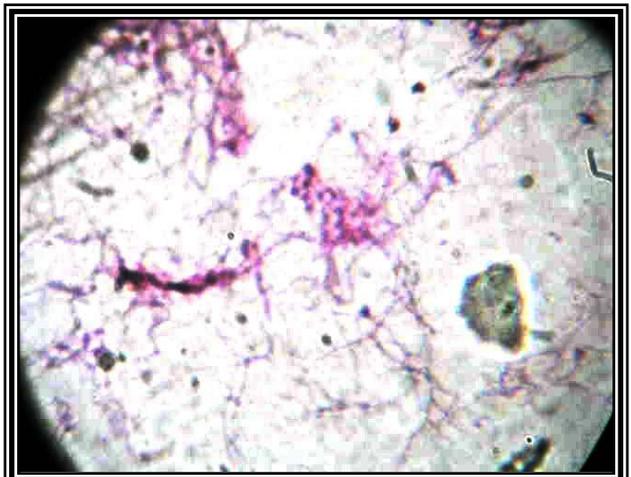


Fig.2: aspect microscopique de la souche S24  
G×100

**Planche n°29** : Aspect microscopique de la souche 24 G×100 (microscope optique).



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S25 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S25 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S25 sur milieu ISP2 (Recto)

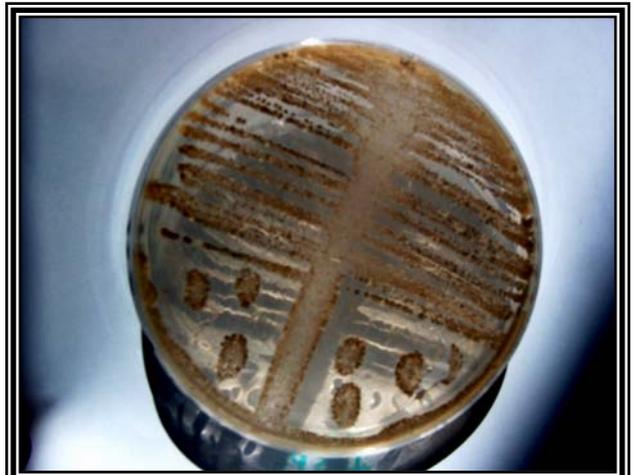


Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S25 sur milieu ISP2 (Verso)

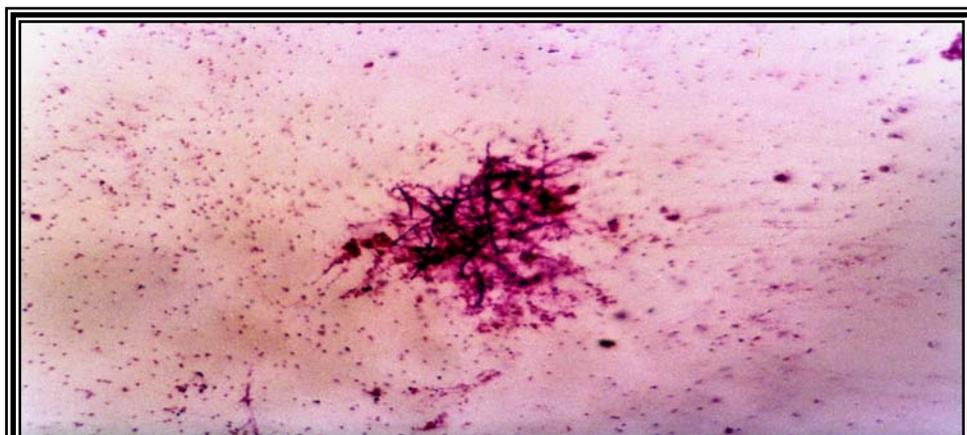


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S25 G×100

**Planche n° 30** : Aspect macroscopique et microscopique des colonies de la souche 25.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S27 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2: aspect macroscopique de la souche S27 sur milieu ISP2 (Verso)

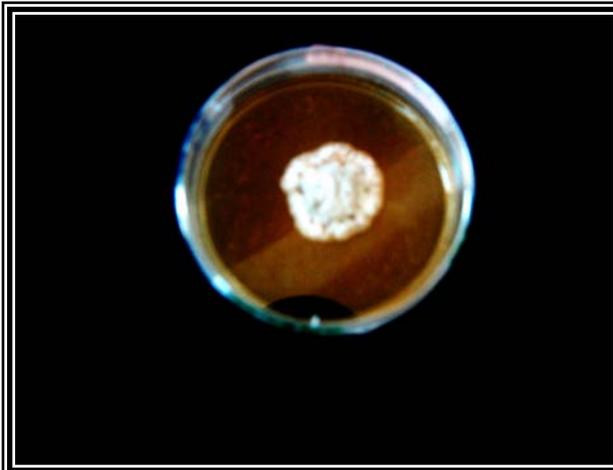


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S27 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S27 sur milieu ISP2 (Verso)

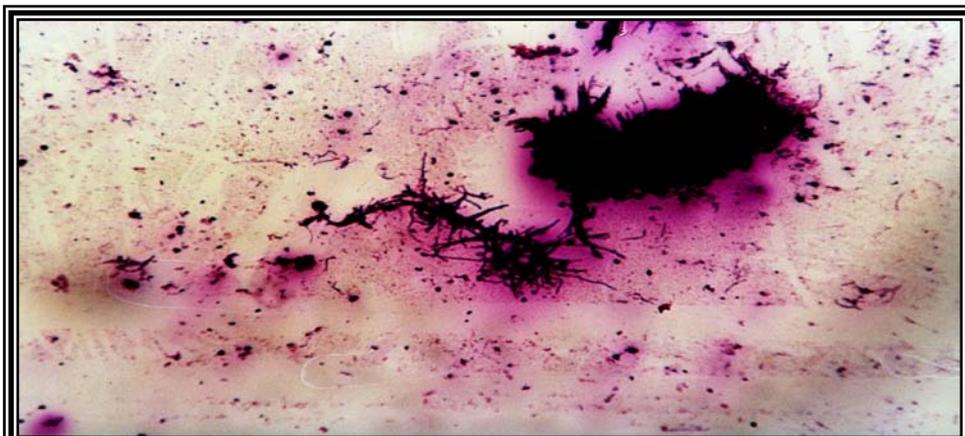


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S27 G×100

**Planche n° 31:** Aspect macroscopique et microscopique de la souche 27.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S28 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S28 sur milieu ISP2 (Verso)

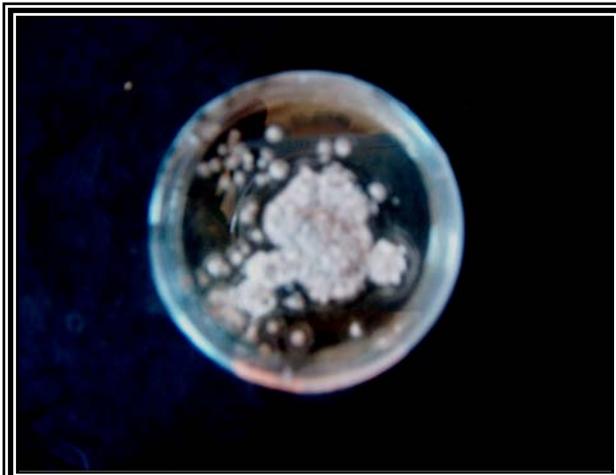


Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S28 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S28 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.5 : aspect microscopique de la souche S28  
G×100



Fig.6 : aspect microscopique de la souche S28  
G×100

**Planche n° 32:** Aspect macroscopique et microscopique de la souche 28.



Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S33 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S33 sur milieu ISP2 (Verso)



Fig.3 : aspect macroscopique de la souche S33 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.4 : aspect macroscopique de la souche S33 sur milieu ISP2 (Verso)

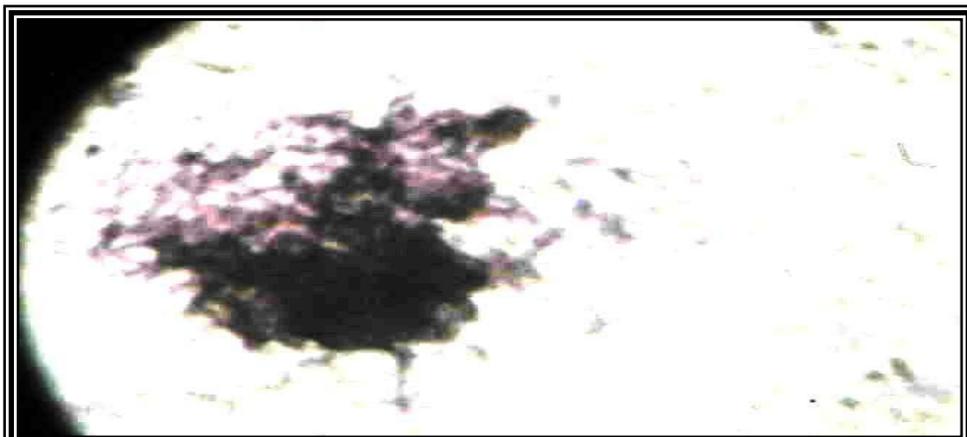


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S33 G×100

**Planche n° 33:** Aspect macroscopique et microscopique de la souche 33.

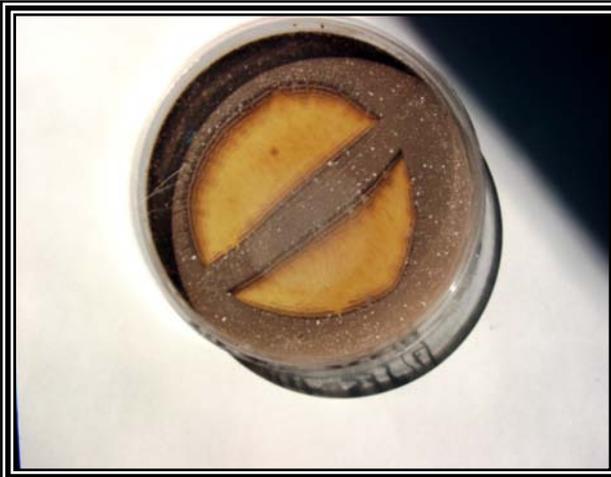


Fig.1 : aspect macroscopique de la souche S35 sur milieu ISP2 (Recto)



Fig.2 : aspect macroscopique de la souche S35 sur milieu ISP2 (Verso)

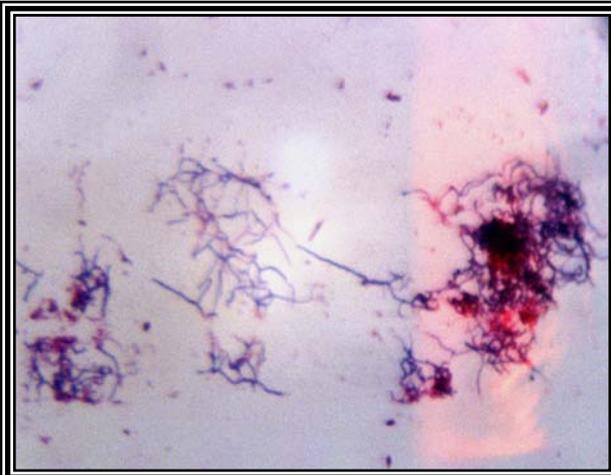


Fig.3 : aspect microscopique de la souche S35 Gx100

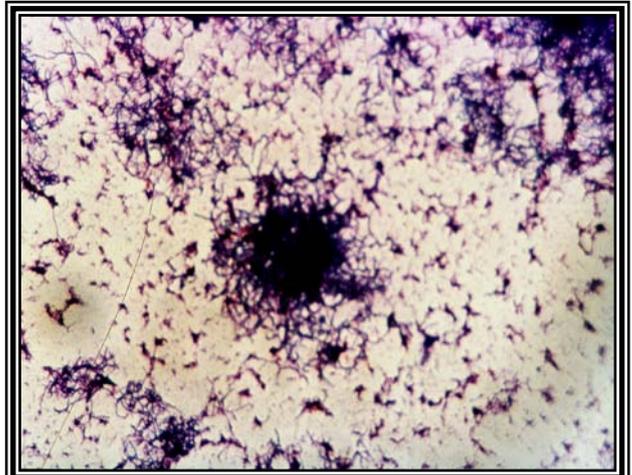


Fig.4: aspect microscopique de la souche S35 Gx100

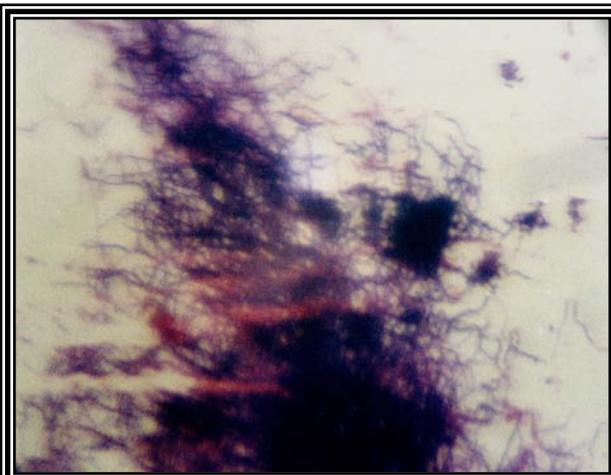


Fig.5 : aspect microscopique de la souche S35 Gx100

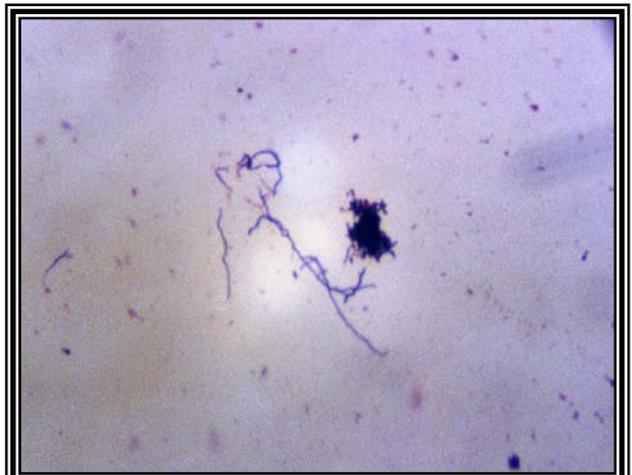


Fig.6 : aspect microscopique de la souche S35Gx100

**Planche n° 34:** Aspect macroscopique et microscopique de la souche 35.

REFERENCES

BIBLIOGRAPHIQUES

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

- 1- Aouadi H., Samraoui B., 1996. Faune supérieure et inférieure du Parc National d'El Kala et sa périphérie inventaire. Statut et conservation. Projet d'aménagement du P.N.E.K. et du complexe des zones humides.
- 2- Chalabi B., projet du plan de gestion du Park National d'El Kala et du complexe des zones humides. Etude 19 (écologie des zones humides).
- 3- Debelair G., Samraoui B., 1997. Connaissances du fonctionnement écologique des zones humides. Établissement des règles de gestion spécifiques. Laboratoire de recherche des zones humides, I.S.N., Université de Annaba.
- 4- Benn O., 1998. Diagnostic sur les eaux usées et l'épuration. Plan de gestion du P.N.E.K. et du complexe des zones humides ., Ecovalor consult GMBH.
- 5- BENYACOUB S.and CHABI Y., 2000. Diagnostique écologique de l'avifaune du Park Nationale d'EL KALA. Publication de l'université de Annaba., p 98.
- 6- SERGE S. and DENISE P., 1998. Ecosystème :Structure – fonctionnement – Evolution., p 429
- 7- LECLERC.H., 1977.Microbiologie appliquée. doin édition., p187.
- 8- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY., 1974. 8th Edition. Buchanan .R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore., 1 268 p.
- 9- DOMMERGUES Y. et MANGENOT F., 1970. Ecologie microbienne du sol. Masson et Cie, Ed., Paris.
- 10- LACEY J., 1973. Actinomycetes in soils, composts and Fodders. In: Actinomycetales : characteristics and practical importance. Sykes G. and Skinner F.A. (Eds), Academic Press, London., pp 231-251.

- 11- BREUILLAND J., LEMOINE A., MICHEL G. et OLLE J., 1974. Etude des actinomycetes aérobies. Rencontres dans l'air de Toulouse. Rev. Inst. Pasteur, Lyon, Fr., 7: pp269-278.
- 12- COUCH J.N. et BLAND C.E., 1974. Family IV. Actinoplanaceae. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th Ed., Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds). Williams and Wilkins Co. Baltimore., pp 706-723.
- 13- REED RODRIGUES COELHO R. et DROZDOWICZ A., 1978. The occurrence of actinomycetes in a cerrado soil in Brazil, Rev. Ecol-biol. Sol., 15: pp 459- 473.
- 14- LECHEVALIER M.P., 1981. Ecological associations involving actinomycetes. In: Actinomycetes. Schaal and Pulverer (Eds.) . Zbl. Bakt. suppl., 11 , Gustav Fisher Verlag, Stuttgart-New-York., pp 159-166.
- 15- CROSS T., 1981. Aquatic actinomycetes :a critical survey of the occurrence, growth and role of actinomycetes in aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol., 50: pp397-423.
- 16- GOODFELLOW M. et WILLIAMS S.T., 1983. Ecology of actinomycetes. Ann. Rev. Microbiol., 37: pp 139-216.
- 17- BECKER B., LECHEVALIER M.P., GORDON R.E. et LECHEVALIER H.A., 1964. Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Appl. Microbiol., 12: pp 421-423.
- 18- LECHEVALIER M.P. and LECHEVALIER H.A., 1970a. Composition of whole cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag. Jena., pp 311 – 316.
- 19- MORDARSKA H., MORDARSKI M. and GOODFELLOW., 1972. Chemotaxonomic characters and classification of some Nocardioform bacteria. J. Gen. Microbiol., 71: pp77- 86.
- 20- LECHEVALIER M.P., DE BIEVRE C. and LECHEVALIER H.A., 1977. Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : phospholipid composition. Biochem. Syst. Ecol ; 5: pp 249 - 260.

- 21- MINNIKIN D.E., GOODFELLOW M. et PIROUZ T., 1977. Polar lipid composition in the classification of some Actinomadura species. *Int. J. Syst. bacteriol.*, 27: pp 118-121.
- 22- COLLINS M.D. and JONES D., 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.*, 45: pp 316 - 354.
- 23- HOLT J.G., KRIEG N.R., SNEATH P.H.A., STALEY J.T. and WILLIAMS S.T., 1994. In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Ninth Edition. Williams and Wilkins, Baltimore.
- 24- GOODFELLOW M., 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol.*, 69: pp33-90.
- 25- ATHALYE M., GOODFELLOW M., LACEY J. and WHITER.P., 1985. Numerical classification of Actinomadura and Nocardiosis . *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 35: pp 86-98.
- 26- GOODFELLOW M., STANTON L.J., SIMPSON K.E. and MINNIKIN D.E., 1990. Numerical and chemical classification of Actinoplanes and some related actinomycetes. *Gen. Microbiol.*, 136: pp 19-36.
- 27- STACKEBRANDT E., 1982. What is an actinomycete. *The Actinomycetes.*, 16: pp 132-138.
- 28- STACKEBRANDT E., LUDWIG W., SEEWALT E. et SCHLEIFER K.H., 1983. Phylogeny of spore forming members of the order Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 33: pp173-180.
- 29- STACKEBRANDT E. and SCHLEIGER K.H., 1984. Molecular systematics of actinomycetes and related organisms . In Ortiz-Ortiz, Bojabl and Yakoleff (Editors), *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, Academic Press, Orlando, Florida., pp 485-504.

- 30- STACKEBRANDT E. and KROPPESTEDT R.M., 1987. Union of the genera *Actinoplanes* Couch, *Ampullariella* Couch and *Amorphosporangium* Couch in a redefined genus *Actinoplanes*. *Syst. Appl. Microbiol.*, 9 : pp 110-114.
- 31- SABAOU N., 1988. contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies Algérienne: Systématique et écologie. these de Doctorat Es-Sciences naturelles, option Microbiologie des sols, USTHB, Alger., p192.
- 32- CROSS T. et GOODFELLOW M., 1973. Taxonomy and classification of the actinomycetes. In: *Actinomycetales characteristics and practical importance*. Sykes G. and Skinner F.A. (Eds) . Academic Press, London and New-York ., pp11—112 .
- 33- GOODFELLOW M., ALDERSON G. et LACEY T., 1979. Numerical taxonomy of *Actinomadura* and related Actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, 112: pp 95-111.
- 34- Mc CARTHY A.J. et BRODA P., 1984. Screening for lignin- degrading actinomycetes and characterization of their activity against (<sup>14</sup>C ) lignine- labelled wheat lignocellulose. *J. Gen. Microbiol.*, 130: pp2905-2913.
- 35- JONES D. and KRIEG R., 1989. Bacterial classification V. Serology and chemotaxonomy. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol. 4. Williams S. T., Sharpe M. E. and Holt J, G. (Eds.). Williams and Wilkins Co, Baltimore., 23: pp 2313-2316.
- 36- BECKER B., LECHEVALIER M. et LECHEVALIER H.A., 1965. Chemical composition of cell- wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13 : pp 236-242.
- 37- YAMAGUCHI T., 1965. Comparaison of the cell-wall composition of morphologically distinct actinomycetes. *J. Bacteriol.*, 89: pp 444-453.
- 38- LECHEVALIER H.A. and LECHEVALIER M.P., 1970 b . A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: *The Actinomycetales* . Prauser H. (Ed.). G. Fisher Verlag, Jena., pp 393- 405.

- 39- LABEDA D. P., TESTA R. T., LECHEVALIER M. P. and LECHEVALIER M. A., 1984. *Saccharothrix*, a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiosis*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 34(4): 426-431.
- 40- STACKBRANDT E., KROPENSTEDT R. M., JAHNKE K. D., KEMMERLING C; and QURTHER H., 1994. Transfer of *Streptosporangium viridogriseum* (OKUDA et al. 1966), *Streptosporangium viridogriseum* subsp. *kofuense* (NONOMURA and OHARA 1969), and *Streptosporangium albidum* (FURUMAI et al., 1968) to *Kutzneria* gen. nov. as *Kutzneria viridogrisea* comb. nov., *Kutzneria kofuensis* comb. nov., and *Kutzneria albida* comb. nov., Respectively, and Emendation of the genus *Streptosporangium* . *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: pp 265-269 .
- 41- COLLINS M.D., SHAH H.N. and MINNIKIN D.E., 1980. A note on the separation of natural mixtures of bacterial menaquinones using reverse-phase partition thin layer chromatography . *J. Appt. Bacteriol.*, 48: pp 277-282.
- 42- STACKEBRANDT E., WINNER-FUSSL B., FOWLER V.J. and SCHLEIFER K.H., 1981. Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among spore forming members of the order Actinoniyceales. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 31:pp 420-431.
- 43- GOODFELLOW M., 1985. Actinomycete systematics: present state and future prospects. Sixth Int. Symp. on Actinomycetes biology. Szabo G., Biro S. and Goodfellow M. (Eds)., pp 487- 496.
- 44- NONOMURA H., 1974. Key for classification and identification of 458 species of the streptomycetes included in I.S.P. *J. Ferment. Technol.*, 52: pp 78-92.
- 45- PRIDHAM T.G. and TRESNER H. D., 1974. Family VII. Streptomycetaceae WAKSMAN and HENRICI . In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 8th Ed., Buchanan R. E. and Gibbons N. E., the Williams and Wilkins Co., Baltimore ., pp 747-845.
- 46- WILLIAMS D.H. and FLEMING I., 1989. Spectroscopic methods in organic chemistry. Fourth Edition . Mc Graw Hill book company, London., p 264.

- 47- WILLIAMS S.T., GOODFELLOW M., ALDERSON G., WELLINGTON E.M.H., SNEATH P.H. A. et SACKIN M.J., 1983. Numerical classifications of *Streptomyces* and related genera. *J. Gen. Microbiol.*, 129: pp1743-1 813.
- 48- GOODFELLOW M. and ALDERSON G., 1977. The actinomycetes genus *Rhodococcus*: a home for the “Rhodochrous” complex. *J. Gen. Microbiol.*, 100: pp 99-122.
- 49- LABEDA D.P., 1988. An evaluation of strains of the genus *Saccharothrix* by numerical taxonomic and molecular taxonomic methods . In: *Biology of actinomycetes* 88. Okami Y., Beppu T. and Ogawara H. (Eds.). Japan Society Scientific Press , Tokyo., pp 227-232.
- 50- ASSELINEAU J. et ZALT A J.P., 1973. Les antibiotiques. Structure et exemples de mode d’action. Herman Ed., Paris.
- 51- WAGMAN G.H. et WEINSTEIN M.J., 1980. Antibiotics from *Micromonospora*. *Ann.Rev.Microbiol.*, 34:pp 537 -557.
- 52- STANTIER R.Y., ADELBERG E.A. et INGRAHAM.J.L., 1982. *The microbial world*, 4th Ed., Prentice -Hall, Englewood cliffs, New-Jersey.
- 53- TYRABI G. et ESTIENNE G., 1983. L’avenir des *Streptomyces*. *biofutur.*, pp 33-37.
- 54- KUSTER E., 1976. Chromogenicity of actinomycetes. In: *Actinomycetes, the Boundary microorganisms*. Arai T. (Ed.), Toppan Co. Ltd, Tokyo., pp 43- 54
- 55- ISHIZAWA S. et ARARAGI M ., 1976. Composition of actinomycete population in soil. In: *Actinomycetes, the, boundary microorganisms*. Arai T. (Ed.) toppan Co-Ltd, Tokyo., pp 97-107.
- 57- BECKING J.H., 1974. Family III .FRANKIACEAE. In: *Bergey’s Manuel of Determinative Bacteriology*. 8th ed. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds) Williams and Wilkins Co. Baltimore., pp 701-706.
- 58- MISHRA S.K., GORDON R.E. et BARNETT D.A., 1980. Identification of *Nocardiae* and streptomycetes of medical importance. *J.Clin. Microbiol.*, 11: pp728-736.

- 59- LACEY J., 1981. Airborne actinomycete spores as respiratory allergens.Z.Bakt. Microbiol . Hyg. Suppl ., 11: pp 243-250.
- 60- AVRIL J.L., FRANÇOIS D., HENRY M. & HENRY D., 2000. Bactériologie clinique., p585.
- 61- BROSSARD H., GUYLEYRAL. et TERRY O.,1997. Activité technologiques en microbiologie 2 bactériologies systématiques ., p 157.
- 62- PRESCOTT., HARLEY & KLEIN., 1995.Microbiologie. p887.
- 63- SCHAECHATER., MEDOFF. & EISESTEIN., 1999. Microbiologie et pathologie infectieuse, Edition de BOECK et larcier SA., 922p.
- 64- AVRIL J- L., DABERNAT H., DENIS F., MONTEIL H ., 1992.Bactériologie clinique. 2<sup>eme</sup> edition., p 596.
- 65- PILET C., BOURDON J.L., TOMA B., MARCHAL N., BALBASTRE C., PERSON J.M., 1987. Bactériologie médicale et vétérinaire systématique bactérienne.,p 597.
- 66- LARPENT J- P., 2000. Introduction a la nouvelle classification : les principaux groupes bactériens ., p267.
- 67- FASQUELLE R., 1974. Elément de bactériologie médicale.9<sup>eme</sup> edition., p386.
- 68- BOURGEOIS C.M., MESCLE J.F., ZUCCA j., 1996. Microbiologie alimentaire aspect microbiologique de la sécurité et la quality des aliments., p420.
- 69-SCIIAECIITER. et EISENSTEIN.,1999. Microbiologie et pathologie infectieuse ., P255.
- 70- FERRON A., 1984.Bactériologie Médicale. 12<sup>eme</sup> édition. p 389.
- 71- BROSSARD H., G.LEYRAL. et O.TERRY., 1998.Activités technologiques en microbiologie : bactériologie systématique., p289.

- 72- HACENE H., 1992. Sélection de souches d'Actinomycetales "rares" productrices d'activités antifongiques de nature non polyènique. Purification et caractérisation des principaux antibiotiques synthétisés. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, U.S.T.H.B, Alger., p 281.
- 73- FLEMING A., 1929.In: BETINA V., 1983.- The chemistry and biology of antibiotics. Nanta W.T, and Rekker R.F. (Eds). Amsterdam. Elsevier.
- 74- BU'LOCK J. D., 1965. The biosynthesis of natural products. An introduction to secondary metabolism . Mc Graw-Hill, New-York .
- 75- DUMENIL. et SANGLIER., 1989. Physiologie de la production des antibiotiques. dans: Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J. P. et Sanglier J. J. Masson, Paris., pp 195- 217.
- 76- BERDY J., ASZALOS A. and MC NITT K. L ., 1987. CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites . part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- 77-NEUMAN H.M., 1979. Antibiotiques et agents chimiothérapeutiques anti-infectieux .ed.Maloine S.A.4<sup>eme</sup> ed., p670.
- 78- CANU A., PETER F., 2001. Le préparateur en pharmacie: microbiologie-immunologie., p360.
- 79- GRAHAM L. P., 2001. Chimie pharmaceutique.2e édition De Boeck., 629p.
- 80- LE MINOR L. et VERON L., 1989. Bactériologie médicale. Bd. Flammarion., p794.
- 81- NICKLIN J.,GRAEME K., PAGET T. et KILLINGTON R., 2000. L'essentiel en microbiologie .port royal livres berty editions., Paris., p362.
- 82- FLANDROIS J.P., 2000.Bacteriologie médicale .collection Azay., p301.

- 83- KACHOUR L.,2005.Identification des moisissures isolés à partir des eaux du lac Oubeira ( P.N.E.K) et impact des eaux usées sur la biodiversité., p195.
- 84- Nevzat S., Erman O., Kamil I., Ergin K., Resit O., 2002. Selective Isolation and Numerical Classification of Novel Thermophilic Streptomycetes, Turk J Boil 26., pp 13-24.
- 85- Guiraud JP.,1998. Microbiologie alimentaire.Dunod édition., p615.
- 86- RODIER J, 1978. L'analyse de l'eau: eaux naturelles, résiduaires et eaux de mer. Bd. Dunod. p382.
- 87- RONG Y.W.and MING H.C., 1995. Identification of the Streptomyces strain KS 3-5. Institute of botany, academia sinica, Taipei, Taiwan115; China; Bot.Bull .Ascad.Sin ., 36: pp201-205.
- 88- Shirling E.B., Gottlieb O.,1966. Methods for charcterization of Streptomyces species, Int. jour. Of .Sust.Bacteriology., 16: pp313-340.
- 89- MARCHAL N., BOURDON J. L., RICHARD C., 1882. Les milieux de cultures. Bd. Doin.,p.482.
- 90- Diagnostic Pasteur., 1987. Milieux et réactifs de laboratoire Microbiologie immunologie.V ed., p. 728.
- 91- KOENIG H., 1995. Guide de mycologie médicale. Ed. Ellipses-Marketing. S.A.,p.284.
- 92- STEFKA A.N., NIKOLETA T.and LJUBOMIRA Y.,2005.Taxonomy of Sytreptomycetes sp .strain3B.Journal of culture collections., 4: pp 36-42.
- 93- LARPENT JP. Et LARPENT-Gourgand M., 1997. Memento technique de microbiologie. Tech et documentation lavoisier 3<sup>eme</sup> édition ., p 690
- 94- Mohamedin A. H., 1999. Isolation, Identification and Some Cultural Conditions of a Protease-Producing Thermophilic Strptomycetes Strain Grown on Chicken Feather as a Substrate, Internation Biodeterioration & Biodegradation., 43: pp 13-21.

- 95- JOFFIN J. N., LEYRAL G., 1988. Microbiologie technique. Tome1., p278.
- 96- Fiche technique pour système API 20E.
- 97- Fiche technique pour système API Staph.
- 98- Fiche technique pour système API 20NE.
- 99- RAHAL K., 2005. Standardisation de l'antibiogramme en médecine humaine à l'échelle Nationale. Selon les recommandation de l'OMS ; Alger, ALGERIE., p116.
- 100- BOUTI K., 1997. Les genres rares Planomonospora, Planobispora, Spirillospora et Streptosporangium (Actinomycetes) dans les sols sahariens : Taxonomie numérique et études de quelques uns de leurs antibiotiques. These de magister. ENS.EL Kouba, Alger., p149.
- 101- HILALI L. et al ., 2002. Isolement de Nouvelles souches d'actinomycetes productrices de substances antifongique à partir du milieu naturel marocain .Rev.Biol and Biotech by the marocain Society of Biology ., Canada., 2 :pp 49-53.
- 102- BHAGABATI P., PARKASH G. and VISHWANATH P. A., Studies on the Antibacterial activity of the Actinomycetes Isolated from the Khumbu Region of Nepal.
- 103- ZITOUNI A., BODJELLA H., LAMARI L., BADJI B., MATHIEU F., LEBRIHI A., SABAOU N., 2005. Nocardiosis and Saccharothrix Genera in Saharan Soils in Algeria: Isolation, Biological Activities and Partial Characterization of Antibiotics, Research in Microbiology., 156: pp.984-993.
- 104- B. Badji, A. Riba, F. Mathieu, A. Lebrihi, N. Sabaou, 2005, Acitivité Antifongique d'une Souche d'Actinomadura d'Origine Saharienne sur Divers Champignons Pathogens et Toxinogènes, Jornal de Mycology Médicale vol.15, pp.211-219.
- 105- SATHI Z.S., SUGIMOTO N., KHALIL MD.L. and Gafur M.A., 2002. Isolation of a Yellowish Antibiotic Pigment 4-Hydroxy Nitrobenzene From a Strain of Streptomyces, Pakistan Journal of Biological Sciences., 5 (2): pp 201-203.

- 106- Mellouli L. et al., 2003. Isolation, Purification and Partial Characterization of Antibacterial Activities Produced by a Newly Isolated *Streptomyces* sp. Us24 STRAIN, *Research in Microbiology* 154, pp 345-352.
- 107- BOUDJELLA B.,1994. Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba., 177 p.
- 108- SLAVICA B.L., SANDRA S., KONSTANTINOVIE. and ZORAN B., 2005. UV/VIS Analysis and Antimicrobial Activity of *Streptomyces* Isolates, *Medicine and Biology.*, Vol. 12: pp. 44-46.
- 109- CHRISTOL D., 1978.Savoir interpréter les analyses bactériologiques et les épreuves de sensibilité aux antibiotiques., 4 : p 143.
- 110- NAOKI M., TOSHIO T., MASATO M., NAOKO K., Yoshiko H., Hironobu L., TSUTOMU S., MASA H. and TOMIO T., 1999. Lactonamycin, a New Antimicrobial Antibiotic Produced by *Streptomyces rishiriensis* MJ 773-88k4. *The Journal of Antibiotics.*, Vol. 52: pp 269-275.
- 111- TOUSSAINT V., 1996. Caractérisation d'un antibiotique produit par la souche d'actinomycète EF76 antagoniste à *Phytophthora fragariae* var .Rubi causant le pourridié des racines du framboisier. mémoire de maître ès des sciences. Université de Sherbrooke, Québec, Canada., p52.
112. PLECZAR M.J.et al.,1986. *Microbiology*. Mc Graw-Hill.INE.New York., p918.
- 113- IWAI Y., OMURA S.,1982. Culture conditions for screening of new antibiotics.*J Antibiot.*, 35: pp123-141.
- 114- SHOMURA T .et al., 1979. Studies on actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. *J Antibiotic.*, 32: pp425-427.

- 115- KONTRO M., LIGNELL U., HIRVONEN R .and NEVALAINEN., 2005. pH effects on 10 *Streptomyces* spp. Growth and sporulation depend on nutrients.Lettres in applied Microbiology ., 41:pp 32-38.
- 116- SUROWITZ K.G. and PFISTER RM.,1985. Glucose metabolism and pyruvate excretion by *Streptomyces alboniger*. Can J.Microbiol., 31: pp 702-706.
- 117- MADDEN T., WARD JM. And ISON AP., 1996.Oraganic acid excretion by *Streptomyces lividans* TK24 during growth on defined carbon and nitrogen sources.Microbiology., 142: pp 3181-3185 .
- 118- ANURAG P., ANUPAM S. and. MAJUMDAR SK., 2005. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M27 for the production of antibacterial antibiotic. African Journal of biotechnology., 4: pp 909-910.
- 119- CARBON C., POCIDALO J.J.and CREMIEUX A.C.,1991. les inhibiteurs des  $\beta$ -lactamase. Journée de pharmacologie clinique U.E.R Xavier BICHAT, Paris, France.édition Arnette.,103.
- 120- PORTO A. L. F., AMPOS-TAKAKI G. M. and LIMA FILHO J.L., 1996. Effects of Culture Conditions on Protease Production by *Streptomyces Clavuligerus* Growing on Soy Bean Flour Medium, Applied Biochemistry and Biotechnology.,Vol. 60: 115-116.
- 121- OBOJSKA A.et al., 1999. Degradation of Phosphonates by *Streptomyces* Isolates, Appl Microbio Biotechnol., 51: pp. 872-876.
- 122- Savadogo A.et al., 2004. Antimicrobial Activities of Lactic Acid Bacteria Strains Isolated Form Burkina faso Fermented Milk, Pakistan Journal of Nutrition., 3 :pp 174-179.
- 123- GOURMELEN A., BLONDELET-ROUAULT M.H., and LUC PERNODET J., 1998. Characterization of a Glycosyl Transferase Inactivating Macrolides, Encoded by Gim a From *Streptomyces Ambofaciens*, Antimicrobial Agents and Chemotherapy., Vol 42: pp 2612-2619.

- 124- UGUR A., SAHIN J., BEYATLI Y., 2002. Accumulation of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate in Streptomyces Species During Growth With Different Nitrogen Sources, Turk J Boil., pp 171-174.
- 125- SELMAN A., WAKSMAN., 1961. "the Actinomycetes". Classification Identification and Descriptif of Genre and Species., Vol 2
- 126- BONGCHEOL K., AI-TAI A.M., SEUNG BUM K., PARMASWARI S. and GOODFELLOW M., 2000. Streptomyces Thermocoprophilus sp. Nov., A Cellulose-Free Endo-Xylanase-Producing Streptomycetes, International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology ., 50: pp 505-509.
- 127- BONGCHEOL K., NEVZAT S., ZAKRZEWSKA-CZEWINSKA J. and M., GOODFELLOW M., 1999. International Journal of Systematic Bacteriology.,49: pp 7-17.
- 128- KOOK HAWANG B., SONG W.L., BEOM SEOK K., JUNG Y.L. and SURK S.M., 2001. Isolation and in Vivo and in Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate From Streptomyces Humidus, Applied and Environmental Microbiology., pp 3739-3745.
- 129- LO C.W., LAI J.S., CHEAH H-Y., WONG N.K.I. and HO C.C., 2002. actinomycetes Isolated from Soil Samples From the Crocker Range Sabah, Asean Review of Biodiversity and Environnement Conservation (Arbec).
- 130- LIU D., ANDERSON N.A., and. KINKEL L.L., 1995. Biological Control of Potato Scab in the Field with Antagonistic Strptomycetes Scabies, Diseases Control and Pest Management.
- 131- MIGUELEZ E.M., HARDISSON C. and MANZANAL M.B., 1999. Hyphal Death During Colony Developement in Streptomyces Antibioticus : Morphological Evidence for the Existence of a Process of Cell Deletion in a Multicellular Prokaryote, J. Cell Boil., Vol 145: pp 515-525.

- 132- GOUVEIA E.R., BAPTISTA –NET A.et al., 2001. Optimisation of Medium Composition for Clavulanic Acid Production by *Streptomyces Clavuligerus*, *Biotechnology Letters.*, 23: pp 157-161.
- 133- GASPARI F., PAITAN Y., MAININI M., LOSI D., RON E.Z. and MARINELLI F., 2005. Myxobacteria Isolated in Israel as Potential Source of New Anti-Infectives, *Journal of Applied Microbiology.*, 98: pp 429-439.
- 134- HERNANDEZ-PEREZ G., Goma G. and Rols J.L., 1999. Degradation of Lignosulfonated Compounds by *Streptomyces Viridosporus* Effect of the Culture Medium and the Nature of the Lignosulfonate Molecule, *Wat, RES.*, Vol 33:, pp 1837-1844.
- 135- GAID A., 1984. Epuration biologique des eaux usées urbaines. T :1 .Office des publication universitaires., p261.
- 136- KAH L.L., SU L.Y., SIALOLI X., MUI M.S., ANTHONY E. T., YUE W., SIDNEY Y., TAN Y.H. and CATHERINE J.P., 2000. Isolation of a Novel Protein Tyrosine Phosphatase Inhibitor, 2-Methyl-Fervenulone, and its Precursors from *Streptomyces*. *J. Nat Prod.*, 63: pp 1641-1646.
- 137- ABRASHEV I., RACHEV R. and DONEV T., 2000-2002. Investigation of the Microbial Associations in Water Basins Polluted with Oil, *Journal of Culture Collections.*, vol 3: pp. 38-42
- 138- IKUKO K., NATSUNO C., KIROCHI A. and MASAKIRO N., 1998. de-N-Methylpamamycin-593A and, New Pammycin Derivatives Isolated from *Strptomyces Alboniger*, the *Journal of Antibiotics* vol 52: pp 329-331.
- 139- Jonathan C., 2004. *Infections Diseases, Hospital Pharmacist .*,Vol 11.
- 140- BOUCHEK-MECHICHE K., GARDEN L., NORMAND P. and JOUAN B., 2000. DNA Relatedness Among Strains of *Strptomyces* Pathogenic to Potato in France: Description of Three New Species, *S. Europaeiscabiei* sp. Nov. and *S. Stelliscabiei* sp. Nov. Associated with Common Scab, and *S. Reticuliscabiei* sp. Nov. Associated with Netted Scab, *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, pp 50, 91-99.

- 141- BOUCHEK-MECHICHE K.C.P., ANDRIVON D. and JOUAN B., 2000. Differences in Host Range, Pathogenicity to Potato Cultivars and Response to Soil Temperature Among *Streptomyces* Species Causing Common And Netted Scab in France, *Plant Pathology* .,49: pp.3-10.
- 142- KATI J., JUKKA P., KROSTIAN F.N., ULLA N., JUHA J. and MAIJA-RIITTA H., Synergistic Interaction in Simultaneous Exposure to *Streptomyces Californicus* and *Stachybotrys Chartarum*, Research Article.
- 143- KEBICH M., BENABII C., ADJAL C., 1999. Pollution des eaux superficielles dans un climat semi-aride: La région de Sétif (Algérie). *Cahiers de sécheresse*, Vol 10. N°2., pp 137-142.
- 144- KWANG H.B., SI-MYONG B. and SOO-KWANG H., 1998. Purification and Characterization of *Streptomyces Griseus* Typsin Overexpressed in *Streptomyces Lividans*, *Microbiol. Biothechnol.*, 8 (4): pp.333-340.
- 145- ONANUGA, A., oyi A.R., OLAYINKA B.O. and ONAOLAPO J.A., 2005. Prevalence of Community-Associated Multi-Resistant *Staphylococcus Aureus* Among Healthy Women in Abuja, Nigerai, *AFRICAN Journal of Biotechnology.*, Vol. 4 (9): pp. 942-945.
- 146- LEE P.C., LOH P.C. and HO C.C., 1997. Production of Tylosin by *Streptomyces Fradiae* in Palm Oil Medium, *World Journal of Micorobiology & Biotechnology* .,Vol. 13: pp. 69-71.
- 147- ROSEANN H.L., BARBARA A.F., DONALD E.C., and ROSEMARY L., 1996. Probable Involvement of Thaxtomin a in Pathogenicity of *Streptomyces Scabies* on Seedlings, *Etiology*.
- 148- ROSEMARY L., RAGHIDA A.B., ROBERT A.C., ROSEANN H.L., MICHAEL O. and JOHN C.S., 1995. Differential Production of Thaxtomins by Pathogenic *Streptomyces* Species in Vitro, *Biochemistry and Cell Biology*.

- 149- RUSSELL R.K., HAROLD C.L. and MERVY C., 1991 Correlation of Phytotoxin production with Pathogenicity of Streptomyces Scabies Isolates From Scab Infected Potato Tubers, American Potato Journal., Vol. 68.
- 150- VOURLI S., PERIMENI D., MAKRI A., POLEMIS M., VOYIATZI A., VATOPOULOS A., 2005. Community Acquired MRSA Infections in a Paediatric Population in Greece, Surveillance Report., pp 78-9.
- 151- FILIPPOVA S.N., DUZNETSOV V.D., BVADYAUDINOV D.N. and LYSENKI A.M., 2000. Taxonomic Investigation of Five Streptomyces Cultures Belonging to ISP Standards, Microbiologie., vol.69 : pp 588-592.
- 152- SABAOU N., BOUDJELLA H., MOSTEFAOUI A. , ZITOUNI A. , LAMARI L., BOUTI K., NEDHILI H., NOUASRI A., ZEBIRI S., BADJI B. et BENNADI A., 1998. Rétrospective sur les Actinomycètes des Sols du Sahara Algérien : Sélection, Ecologie, Taxonomie, Ecologie, Taxonomie et Antibiotiques.
- 153- SACHIO H., YOSHITERU H., KIROKI H., KIDEAKI M., HARUO I., SATOSHI O. and MICHIIHIKO K., 2004. Hyper-Inducible Expression System for Streptomyces , PNAS., Vol 101: pp 14031-14035.
- 154- SAMANTHA K., CLAUDIO A. & MICHAEL E.B., 2000. Growth Limiting Substrate Affects Antibiotic Production and Associated Metabolic Fluxes in Streptomyces Clavuligerus, Biotechnologie Letters., 22 : pp 1803-1809.
- 155- SATOSHI O., YUMI E., MAYUMI S., YOKO T., YUZURU I. and Kazuro S., 1998. Isolation and Structure of a New Antibiotic Viridomucin F Produced by Streptomyces sp. K96-0188, the Journal of Antibiotics., vol 52: pp 61-64.
- 156- SEFA C. et al ., 1999. Analysis of Methicillin Resistant Staphylococcus aureus Isolates by Polyacrylamide Gel Electrophoresis in An Intensive Care Unit of Ibni-Sina Hospital, Turk J Med SCI 30., pp. 367-371.
- 157- SEUNG B.K., CHRISTINE F., EDWIN W. and GOODFELLOW M., 1998. Streptomyces Thermocarboxydovorans sp. Nov. And Streptomyces Thermocarboxydus sp.

Nov., Two Moderately Thermophilic Carboxydophilic Species From Soil, *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 48:pp 59-68.

158- SLAVICA B.I., SANDRA S.K., ZORAN B.T., 2005 UV/VIS Analysis and Antimicrobial Activity of Streptomyces Isolates, *Medicine and Biology.*, Vol. 12: pp. 44-46.

159- UWAEZUOKE J.C., ARIRIATU L.E, a Survey of Antibiotic Resistant Staphylococcus aureus Strains From Clinical Sources in Owerri, *SCI. Environ. MGT.*, Vol. 8 (1): pp. 67-69.

160- RODRIGUEZ-NAVA V., MARIN-LOPEZ Y., SANDOVAL H. and PEREZ-MIRAVETE A., 2000. Isolation of Streptomyces sp. In Routine Blood Cultures from Children in Mexico City, *J Mycol Med.*, 10: pp162-163.

161- Vincent A.S.et al., 1996. Rapid Identification of Clinically Significant Species and Taxa of Aerobic Actinomycetes, Including Actinomadura, Gordona, Nocardia, Thodococcus, Streptomyces, and Tsukamurella Isolates, by DNA Amplification and Restriction Endonuclease Analysis, *Journal of Clinical Microbiology.*, pp 817-822.

162- WOLFGANG M., JAMES E.B. & WOUTER D., 2000. Streptomyces in Micro-Cultures: Growth, Production of Secondary Metabolites, and Storage and Retrieval in the 96-Well Format, *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 78: pp 297-305.

163- XU P., YUKIHIRO A., KEN-ICHI F., TOSHIO T. and MAKOTO T., 1998. the Mode of Action of AKD-2c, an Antifungal Antibiotic form Streptomyces sp. OCU-42815, the *Journal of Antibiotics.*

164- YOKO Y., TAKANORI K., YOXHIKUNI H., KUNIMOTO H., KIDEAKI U. and KEN-ICHI H., 1998. Distribution and Identification of Actinomycetes Lysing Cyanobacteria in a Eutrophic Lake, *journal of applied Phycology.*, 10: 391-397.

165- YOSHINORI T., AKIKO A., TOMOFUMI O., YOSHIKI O., NAOTO K. and YASUHIDE F., 1996. Antibiotic Susceptibility of Staphylococcus sp. Collected From the Entrance Hall of the New Dispensary at Tottri University Hospital, *Yaonago Acta Medica.*, 39: pp 109-112.