REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR
ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE KASDI MERBAH, OUARGLA
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DES SCIENCES BIOLOGIQUES

Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie.

Filière : Biologie.

Spécialité : Microbiologie.Appliquée.

Présente par : BACHOUCHE Hamida

YAGOUBI Ibtissam

Thème

Production et extraction d'antibiotiques à partir d'une souche d'actinobactéries AHO23 (Saccharothrix sp.)

Soutenu le : 30/09/2020

Devant le jury :

BEN AISSA Atika	MCA	Présidente	UKM Ouargla
BOURICHA Mhamed	MAA	Examinateur	UKM Ouargla
SAADI Sid Ahmed	MAA	Encadreur	UKM Ouargla
BELDI Nadia	MCB	Co-promotrice	UKM Ouargla

Année universitaire : 2019/2020

Remerciements

Au terme de ce modeste mémoire, nous tenons tout d'abord à remercier Allah, qui nous a donné la force et la volonté pour arriver au bout de nos études.

Hommage à notre cher Professeur **SABAOU Nasserdine** «le père des actinobactéries», connu par ses très grandes qualités humaines et scientifiques. Sa rencontre a été une aubaine, qui nous a permis de bénéficier de ses conseils avisés et ses encouragements. Que son âme repose en paix dans le paradis d'ALLAH.

Nous tenons à exprimer notre profonde gratitude à notre encadreur Monsieur **SAADI Sid Ahmed** maître assistant A de université KASDI Merbah Ouargla pour ses aides, sa disponibilité, ses orientations fructueuses, et pour avoir mis à notre disposition les ressources nécessaires à la réalisation de ce thème.

Nous adressons à notre Co-promotrice, Mlle **BELDI Nadia** maître de conférences B à UKM Ouargla nos remerciements pour ses conseils et sa gentillesse.

Nos gratitudes s'adressent aux membres du jury :

Madame **BENAISSA Atika** maître de conférences A à UKM Ouargla qui nous fait l'honneur de présider notre jury.

Monsieur **BOURICHA Mhamed** maître assistant A á UKM Ouargla pour avoir ménagé son temps afin d'examiner ce travail.

Nous tenons à exprimer nos remerciements à tout le personnel du laboratoire de LBSM de Kouba Alger, en particulier Mme **YAICHE ACHOUR Hafsa,** Mme **YOUSFI Kheira**, M **TOUMATIA Omrane**, ainsi que notre chère collègue **TITOUAH Nour el houda** et à tous les membres du Laboratoire LBSM, pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et leur sympathie.

Nous remercions chaleureusement notre chère amie, collègue et sœur **KHERRAZ Assia** pour sa collaboration et son soutien moral.

Nous ne manquons pas de remercier profondément tous les enseignants qui ont contribué à nous transmettre l'inestimable trésor qui est le savoir.

Enfin, Nous remercions toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de ce modeste travail.

Dédicace

C'est avec un immense plaisir que je dédie ce modeste travail :

Á L'ÉSPRIT DE L'HOMME QUI MARQUERA Á JAMAIS MA VIE, MON GRAND PÉRE PATERNEL : LE PIONNIER DE LA PHILOSOPHIE EN ALGERIE PROFESSEUR **MAHMOUD YAGOUBI**

Qui a été mon modèle et mon inspiration depuis toujours et qui a toujours aimé de voir ses enfants gravir les échelons de la connaissance. Que son âme repose en paix dans le paradis d'ALLAH.

Á MA TRÈS CHÈRE MÈRE : **SOUFFI Nadjat**

Autant de phrases aussi expressives soient-elles ne sauraient montrer le degré d'amour et d'affection que j'éprouve pour toi. Tu m'as comblé avec ta tendresse et encouragements tout au long des années de mes études.

Á MON TRÈS CHER PÈRE : **Mohammed Arabi**

L'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime et de mon respect. Aucune dédicace ne saurait exprimer mes sentiments.

Á MES TRES CHERS GRAND-PERE, GRAND-MERE MATERNELLE ET GRAND-MERE PATERNELLE

Que ce modeste travail, soit l'expression des vœux que vous n'avez cessé de formuler dans vos prières. Puisse le tout puissant vous donner santé, bonheur et longue vie.

Á MON FRERE **Aymen**, qui m'a sorti du stress avec sa joie.

Á MON CHER ONCLE **Youcef**, qui a tout fait pour me voir la plus performante possible, autant de phrases aussi éloquentes soient-elles ne sauraient exprimer ma reconnaissance.

Á MES TRES CHERES TANTES **Khadidja, Wassima** et **Karima** qui ont toujours été en soutien quand j'en avais besoin.

Á MES CHERS ONCLES, on particulier mon oncle **Yasser** et sa femme **Zahra** qui a été une grande sœur pour moi.

Á MA CHERE BINOME ET SŒUR, **Hamida**.

Á MES CHERES COUSINES, en particulier ma petite **Razouna**.

Et finalement à ma sœur de cœur **Amina**, et à mes amies **Bessma**, **Iman**, **Hadjer, Roufida** et **Lina**.

Ibtissam

Dédicace

Je tiens a dédié avec un grand plaisir ce modeste travail :

Á MA CHÉRE MÉRE : **MECHACHE Louiza**

Tu m'as donné la vie, la tendresse et le courage pour réussir. Tout ce que je peux t'offrir ne pourra exprimer l'amour et la reconnaissance que je te porte. Je t'offre ce modeste travail pour te remercier pour tes sacrifices et l'affection dont tu m'as toujours entourée.

Á MON CHER PRÉRE : **BACHOUCHE Aissa**

Tu as su m'inculquer le sens de la responsabilité, de l'optimisme et de la confiance en soi face aux difficultés de la vie. Tes conseils ont toujours guidé mes pas vers la réussite. Ta patience sans fin, ta compréhension et ton encouragement sont pour moi le soutien indispensable que tu as toujours su m'apporter. Je te dois ce que je suis aujourd'hui et ce que je serai demain et je ferai toujours de mon mieux pour rester ta fierté et ne jamais te décevoir.

Que Dieu vous préserve, vous accorde santé, bonheur, quiétude de l'esprit et vous protège de tout mal.

Á MA GRAND MERE, Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur. Á MA CHERE TANTE **Aicha**, puisse Dieu les prêter longue vie, de santé et de bonheur.

Á MA CHERE SŒUR **Amina** et son mari **Ahmed Abdlefateh** et sa famille **ABDERAHIM**. Aucune dédicace ne saurait exprimer tout l'amour que j'ai pour vous, votre encouragement et votre gaieté me comblent de bonheur. Puisse Dieu vous garder, éclairer votre route et vous aider à réaliser à votre tour vos vœux les plus chers.

Á MA CHERE PETITE SŒUR de cœur **Hanane** que j'aime plus que tout.

Á MON TRES CHER frère **Abd Allah** et son époux **Kahina** en gage de ma profonde estime pour l'aide que vous avez m'as apportés, réconfortés et encouragés.

Á MES CHOUCHOUS **Saber**, **Younes** et **Lina**.

Á MA CHERE BINOME ET SŒUR, **Ibtissam**.

Á MES CHERES COUSINES, en particulier ma chère **Asma**.

Á MES CHERES AMIES **Bessma**, **Iman**, **Roufida**, **Maroua**, **Leila, kalthoum** et **Fatima**. En témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur.

Hamida

TABLE DES MATIERES

Remerciements

Dédicace

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abreviations

Introduction 1

Première partie : Synthèse bibliographique

Chapitre I. Taxonomie des actinobactéries et du genre Saccharothrix

I.1.Définition des actinobactéries 3

I.2. Historique sur les actinobactéries 3

I.3. Ecologie des actinobactéries du genre *Saccharothrix* 4

I.4. Taxonomie des actinobactéries 4

I.4.1. Critères morphologiques 5

I.4.1.1. Critères macromorphologiques 5

I.4.1.2. Critères micromorphologiques 5

I.4.2. Critères chimiotaxonomiques 6

I.5. Taxonomie de *Saccharothrix* 6

I.6. Position taxonomique du genre *Saccharothrix* 6

I.7. Caractéristiques du genre *Saccharothrix* 7

I.7.1. Caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques 7

I.7.2. Caractéristiques chimiotaxonomiques et physiologiques 8

I.8. Espèces appartenant au genre *Saccharothrix* 9

I.9. Métabolites secondaires sécrétés par *Saccharothrix* 10

Chapitre II. Les antibiotiques

II.1.Définition des antibiotiques 11

II.2.Classification des antibiotiques 11

II.3.Microorganismes producteurs d'antibiotique 12

II.4.Biosynthèse des antibiotiques 13

II.5.Régulation de la biosynthèse des antibiotiques 13

II.5.1. Facteurs physico-chimiques 133

II.5.2. Inoculum 14

II.5.3. Facteurs nutritionnels 15

II.6. Mécanisme d'action des antibiotiques 16

II.6.Résistance aux antibiotiques 17

Deuxième partie : Partie expérimentale

Chapitre III. Matériels et Méthodes

III.1. Lieu de stage 19

III.2. Matériel 19

III.2.1. Matériel non biologique 19

III.2.2. Matériel biologique 19

III.2.2.1. La souche AHO23 de S*accharothrix* 19

III.2.2.2. Germes cibles utilisés 19

III.3.METHODES 20

III.3.1. Identification de la souche AHO23 20

III.3.1.1. Étude morphologique 20

III.3.1.2. Étude physiologique 20

III.3.1.2.1. Utilisation des composés glucidiques 20

III.3.1.2.2. Utilisation de divers autres composés organiques 21

III.3.1.2.3. Production de nitrate réductase 21

III.3.1.2.4. Production de pigments mélanoïdes 21

III.3.1.3. Identification moléculaire 22

III.3.1.3.1. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et phylogénie (pour la souche AHO23) 22

III.3.1.3.2 Analyses phylogénétiques 22

III.3.2 Production des antibiotiques par la souche AHO23 22

III.3.2.1.Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche AHO23 sur milieu solide ... 22

III.3.2.1.1. Préparation de culture de la souche AHO23 22

III.3.2.1.2. Préparation des suspensions des germes cibles 23

III.3.2.1.3. Test d'antagonisme « Méthode des cylindres d'agar » 23

III.3.2.2. Cinétique de pH, de croissance et de la production des antibiotiques par la souche AHO23 en milieu liquide 24

III.3.2.2.1. Préparation de l'inoculum de la souche AHO23 24

III.3.2.2.2. Préparation des pré-cultures 25

III.3.2.2.3. Milieux de cultures utilisés 25

III.3.2.2.3.1. Préparation des sources de carbone 25

III.3.2.2.3.2. Ajustement de pH des milieux de culture et la stérilisation 26

III.3.2.2.4. Préparation des cultures 26

III.3.2.2.5. Prélèvement 26

III.3.2.2.6. Test d'activité antibactérienne 27

III.3.2.2.7. Suivi du pH des cultures de la souche AHO23 27

III.3.2.2.8. Suivi de la croissance de la souche AHO23 28

III.3.3.Recherche du meilleur solvant d'extraction antimicrobien de la souche AHO23 28

III.3.3.1. Préparation des cultures 28

III.3.3.2. Extraction des substances antimicrobiennes 28

III.3.3.3.Antibiogramme 30

III.3.3.4. Analyse de l'extrait de la souche AHO23 par HPLC 31

Chapitre IV. Résultats et discussion

IV.1 ETUDE TAXONOMIQUE DE LA SOUCHE AHO23 33

IV.1.1. Caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques d'isolat 33

IV.1.1.1. Résultats 33

IV.1.1.1.1 Caractéristiques macro et micromorphologiques 33

IV.1.1.1.2. Caractéristiques physiologiques 34

IV.1.1.1.3. Caractéristiques phylogénétiques 35

IV.1.1.2. Discussion 36

IV.2.PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES PAR LA SOUCHE AHO23 37

IV.2.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche AHO23 sur milieu solide 37

IV.2.1.1 Résultats 37

IV.2.1.2. Discussion 39

IV.2.2. Cinétique de croissance, de pH et de production des antibiotiques par la souche AHO23 en milieu liquide 40

IV.2.2.1. Résultats 40

IV.2.2.1.1 Milieu ISP2 40

IV.2.2.1.2 Milieu MS additionnée de dextrine 42

IV.2.2.2. Discussion 43

IV.3. Etude des molécules bioactives produites par *Saccharothrix sp.* AHO23 44

IV.3.1. Résultats 44

IV.3.1.1. Extraction et mise en évidence des antibiotiques par antibiographie 444

IV.3.1.2. Purification des molécules bioactives par HPLC 46

IV.3.2. Discussion 47

Conclusion et perspectives 499

Références bibliographiques

Annexes

Résumé

LISTE DES TABLEAUX

Tableau n°	Titre des tableaux	Page
1	Position taxonomique de *Saccharothrix.sp*.	7
2	Espèces du genre *Saccharothrix*, d'après le National Center for Biotechnology Information (NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov /Taxonomy).	9
3	Les principales substances bioactives ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre *Saccharothrix* (Bouras, 2005).	10
4	Les principaux antibiotiques et leur classification (Joffin et Leyral, 2014).	12
5	Conditions d'élution des antibiotiques par HPLC.	31
6	Caractéristiques culturales de la souche AHO23.	34
7	Comparaison des caractéristiques physiologiques de la souche AHO23 avec l'espèce de *Saccharothrix xinjiangensis*.	34
8	Activité antagoniste de l'isolat AHO23 de *Saccharothrix sp.* contre les germes -cibles par la méthode des cylindres d'agar.	38
9	Zones d'inhibition (mm) de la phase organique de la souche AHO23 issue de l'extraction par l'utilisation des 04 solvants organiques.	45

LISTE DES FIGURES

Figure n°	Titre des Figures	Page
1	Une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre d'actinomycète le plus abondant dans la nature, *Streptomyces* (ln : Bergy, 1989).	8
2	Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques retrouvés chez les bactéries (Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012).	18
3	Activité antagoniste de la souche AHO23 vis-à-vis des germes cibles sur milieu ISP2 par la méthode des cylindres d'agar.	24
4	Mise en évidence de l'activité de la souche AHO23 sur ISP2 par la méthode des puits.	27
5	Extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures.	29
6	La méthode de l'antibiogramme.	30
7	Schéma de l'installation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC Agilent®1260).	32
8	Macromorphologiques(A) et Micromorphologie(B) de la souche AHO23. Les chaine de spores de la souche AHO23 poussant sur milieu ISP2 et observés au microscope optique (grossissement 10 x 40).	33
9	Arbre phylogénétique (neighbor-joigning) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche AHO23.	35
10	Cinétique de croissance, de pH et de production des antibiotiques par la souche AHO23 sur le milieu ISP2.	41
11	Cinétique de croissance, de pH et de production des antibiotiques par la souche AHO23 en milieu MSD.	42
12	Activité antibactérienne de l'extrait organique de la souche AHO23. a : *L.monocytogenes* sur milieu ISP2, b : *E. coli* sur milieu ISP2.	45
13	L'extrait organique obtenu par le dichlorométhane provenant à partir d'une culture de la souche AHO23 sur le milieu ISP2 pendant 6jours.	46
14	Profil d'élution en HPLC analytique obtenu à 575 nm de l'extrait au dichlorométhane de la souche AHO23	47
15	PH mètre (HANA pH211)	Annexe n°1

16	Autoclave (pbi 96 de 65 litre)	Annexe n°1
17	Centrifugeuse (Jouan E96)	Annexe n°1
18	Rotavapeur (Stuart)	Annexe n°1
19	HPLC (Agilent®1260)	Annexe n°1
20	Etuve (Memmert)	Annexe n°1
21	Microcentrifuge des eppendorfs (Sigma)	Annexe n°1
22	Shaker New (Brunswick Scientific)	Annexe n°1
23	Four Pasteur (Memmert)	Annexe n°1
24	Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *Sa.S.*	Annexe n°5
25	Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *M3*.	Annexe n°5
26	Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *BS*.	Annexe n°5
27	Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *Agro*.	Annexe n°5
28	Activité antibactérienne de la souche AHO23 contre *LM*.	Annexe n°5
29	Activité antibactérienne de la souche AHO23 contre *E.coli*.	Annexe n°5
30	Activité antibactérienne de la souche AHO23 contre *Sa 639*.	Annexe n°5

LISTE DES ABREVIATIONS

La liste des abréviations des antibiotiques et des antifongiques		
AM : ampicilline	**AMB :** Amphotéricine B	**AMC:** amoxicilline + clavulanate
AMX: Amoxicilline	**AN:** Amikacine	**C :** Chloramphénicol
CAR : carbénicilline	**CAZ :** ceftazidime	**CF :** céfalotine
CHX : cycloheximide	**CHL :**Chlorotétracycline	**CIP :** ciprofloxacine
CLD : clindamycine	**COT :** Cotrimoxazole	**CRO :** ceftriaxone
CS : colistine	**CTX :** céfotaxime	**CXC :** céfotaxime + acide clavulanique
CXM : céfuroxime	**ERY:** érythromycine A	**FEP :** céfépime
FLU : Fluoroquinolones clavulanique	**FOS :** fosfomycine	**FOX :** céfoxitine
GEN : gentamicine	**GLY :** Glycopeptides	**HM :** Hygromycine
IPM : imipénème	**ITR :** itraconazole	**K :** kanamycine B
KM : Kanamycine	**LIN :** lincomycine	**MET :** méthicilline
NEO : néomycine	**NOR:** norfloxacine	**NYS:** nystatine
OFL : ofloxacine	**OXA :** oxacilline	**PEN :** pénicilline G
POS : posaconazole	**PRL :** pirlimycine	**RIF :** rifampicine
SPI : spiramycine	**SSS :** sulfamide	**SXT :** triméthoprime – sulfamétoxazole
TCC : ticarcilline + acide clavulanique	**TE :** tétracycline	**TER :** terbinafine
TIC : ticarcilline	**TIZ :** thioconazole	**TMP :** triméthoprime
TOB : tobramycine	**VAN:** vancomycine	**VOR:** voriconazole

q.s.p : quantité suffisante pour.

µL: Microlitre.

GLY : Glycopeptides.

Rpm : rotation par minute.

HPLC: High Performance Liquid Chromatography.

ISP2 : International *Streptomyces* Project 2.

MA : Mycélium aérien.

MS : Mycélium du substrat.

PS : pigments solubles.

MH : Mueller Hinton.

MS : Milieu synthétique.

MSS : Milieu semi synthétique.

NCBI : National Center for Biotechnology Information.

Introduction

Introduction

En 1928, Alexandre Fleming a découvert le premier antibiotique nommé pénicilline, et c'est lui qui a informé la communauté scientifique que l'usage abusif et inapproprié des antibiotiques conduira dans un proche avenir, à l'apparition des souches résistantes à ces substances. A l'heure actuelle, nous sommes confrontés malheureusement à sa prédiction ; l'émergence des bactéries multi résistantes qui menacent la santé mondiale conjuguée au choix limité des classes d'antibiotiques et à l'absence de la découverte de nouvelles molécules. Cela incite les scientifiques à rechercher des molécules naturelles inconnues présentant de nouveaux mécanismes d'action plus efficaces, afin de poursuivre la lutte contre les microorganismes pathogènes multi résistants **(Durand et *al.*, 2018; Djinni et *al.*, 2019).**

En 1944, c'était la découverte du 1er antibiotique "la streptomycine" produit par les actinobactéries, aujourd'hui on peut dire que ces microorganismes retiennent particulièrement l'attention des chercheurs et semblent êtres d'excellents candidats producteurs des molécules actives originales aux propriétés intéressantes et structure chimique très diversifiée. Elles sont employées dans plusieurs domaines, non seulement dans le domaine pharmaceutique mais aussi dans la science vétérinaire, l'agriculture et l'industrie **(Moulin et Coquerel, 1998 ; George et *al.*, 2012; Solecka et *al.*, 2012; Bouznada, 2018;Tata, 2020).**

La majorité des antibiotiques utilisés en clinique sont produits par les actinobactéries, qui sont des bactéries Gram positives à pourcentage G + C élevé, les différenciant des autres bactéries. Elles partagent les caractéristiques des bactéries et des champignons dont plusieurs formant généralement des hyphes ramifiés et des spores asexuées non mobiles ou parfois mobiles à un certain stade de leur développement. Elles présentent aussi un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits **(Locci et Sharples, 1984 ; Bouras, 2005 ; Van Der Heul et *al.*, 2018; Williams et *al.*, 2019).**

Plusieurs travaux des chercheurs du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) ont révélé l'écosystème particulier et extrême des régions arides d'Algérie, ainsi que leur richesse et biodiversité surprenante en actinobactéries, ce qui a abouti à l'isolement de plusieurs souches intéressantes **(Lahoum, 2017 ; Bouznada, 2018).**

Les chercheurs ont commencé à s'orienter vers les environnements extrêmes et chercher des taxons rares, comme le genre *Saccharothrix* ; c'est un genre peu fréquent d'actinobactéries possédant un matériel génétique unique traduit par son système enzymatique et métabolique particulier, qui lui permet de s'adapter aux conditions de vie très difficiles. En plus, les souches

appartenant au genre *Saccharothrix* s'avèrent des producteurs de molécules à spectres d'action intéressants contre plusieurs germes pathogènes **(Solanki et *al.*, 2008; Genilloud et *al.*, 2011).**

Dans ce travail, nous somme**s** intéressés par ce genre, qui a montré un réel pouvoir antagoniste contre les germes pathogènes et s'est révélé être l'un des nouveaux genres secrétant de nouveaux antibiotiques. Aussi, il y'a lieu de préciser que la souche de *Saccharothrix* étudiée a été isolée par Mr SAADI chercheur au niveau du LBSM, ENS de Kouba, Alger.

Le manuscrit est subdivisé en deux parties :

La première est consacrée à une synthèse bibliographique, elle comporte deux chapitres, le premier chapitre sur les actinobactéries et le genre *Saccharothrix*, et le deuxième chapitre sur les antibiotiques, leur production et leur classification.

La deuxième partie qui est divisée en deux chapitres, le premier chapitre présente l'ensemble des méthodes et techniques utilisées pour la réalisation de ce travail. En premier lieu, notre souche étudiée a été mise dans des conditions nutritionnelles et physiologiques appropriées, afin d'améliorer la production conduisant à une production maximale des molécules d'intérêts. En second lieu, il a été procédé à l'évaluation de l'activité antagoniste de la souche *Saccharothrix sp*. (AHO23), la production et l'extraction des molécules bioactives élaborées par cette souche, et enfin l'analyse par HPLC des extraits actifs. Le deuxième chapitre est réservé à la présentation des résultats et leur interprétation.

La conclusion du travail réalisé ainsi que les perspectives qui en découlent clôturent ce manuscrit.

Première partie
Synthèse bibliographique

Chapitre I
Taxonomie des actinobactéries et du genre Saccharothrix

I.1.Définition des actinobactéries

Les actinobactéries précédemment appelées actinomycètes, du fait de leur morphologie fongoïde (filaments ramifiés, organes de sporulation etc.), elles ont été considérées comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons, mais leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques approuvent de les classer parmi les procaryotes **(Williams et *al.*, 1973 ; Habbibeche, 2012).**

Elles sont caractérisées par une teneur élevée en guanine et cytosine (GC >55%) dans leur ADN (Pandey, 2018). Ces microorganismes sont des bacilles à gram positive, saprophytes, immobiles et hétérotrophes mais certains sont chimio-autotrophes, aérobies, mésophiles et croissent de façon optimale dans la gamme de pH 5,0 à 9,0 avec une proximité idéale à la neutralité **(Williams et Wellington, 1982 a ; Goodfellow et Williams, 1983).**

Plusieurs espèces des actinobactéries sont connues pour leur capacité à produire de nombreux métabolites secondaires synthétisés naturellement, ayant des activités biologiques diverses et jouent un rôle important au niveau de la minéralisation des sols et dans la décomposition des matériaux biologiques (**Belferkh et Megoura, 2016).**

I.2. Historique sur les actinobactéries

L'histoire des actinobactéries a été divisée selon Waksman en cinq grandes périodes :

- Première période (1874-1900) : En 1875 Ferdinand Cohn fut le premier à décrire un actinomycète nomma *Actinomyces bovis,* un organisme parasite trouvé dans une infection de la mâchoire d'un bovin qui désigne l'agent responsable de la maladie du bétail. Cette période a été nommée «période médicale » du fait du rôle des actinomycètes dans la pathologie **(Merizig, 2015).**
- Seconde période (1900-1940) : Cette période concerne à la mise en évidence de l'étude des actinomycètes du sol selon les travaux de **Rossi-Doria (1890-1891), Waksman (1919)**, **Lieske (1921)** et **Jensen (1931-1933),** et à la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes **(Djebbah, 2016).**
- Troisième période : Cette période commence en 1940, est reconnue par la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes. Waksman a découvert l'actinomycine à partir d'une culture de *Streptomyces antibioticus*. Et puis en 1944 la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* **(Djebbah, 2016).**
- Quatrième période (1940-1970) : Est caractérisée par le développement des critères morphologiques, biochimiques et physiologiques pour la classification des actinomycètes, et de

leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et la biodégradation de composés organiques **(Belyagoubi, 2014).**

- Cinquième période : Depuis les années 1960, des méthodes génétiques initiées par Hopwood pour la classification des espèces et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes **(Abriche et Benamira, 2018).**

I.3. Ecologie des actinobactéries du genre *Saccharothrix*

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires, que l'on rencontre sur tous les substrats naturels et artificiels **(Larpent et Sanglier, 1989 ; Saker 2015)**, et elles ne sont pas limitées à des habitats spécifiques **(Hussein et *al.*, 2018).**

Le genre *Saccharothrix* reste minoritaire parmi les actinobactéries. Il colonise des écosystèmes très variés tels que les eaux usées, les sols désertiques salés et alcalins, voire les sédiments océaniques et les gisements de minéraux **(Schippers et *al.*, 2002 ; Hozzein et *al.*, 2004 ; Zitouni et *al.*, 2005; Hamdar,2018).** La majorité des espèces de *Saccharothrix* sont d'origine tellurique du sol. La première espèce assignée à ce genre, *S. australiensis* ATCC 31947^{T}, a été isolée du sol de l'Australie **(Labeda et *al.*, 1984)**. Beaucoup d'espèces sont isolées de sols arides au sud Algérien, deux d'entre elles, *S. algeriensis* SA233^{T} **(Zitouni et *al.*, 2004b)** et *S. hoggarensis* SA181^{T} **(Boubetra, 2013)** ont été décrites et publiées comme nouvelles espèces.

I.4. Taxonomie des actinobactéries

La taxonomie est l'étude qui décrit, regroupe les microorganismes, afin de les identifier, les nommer et les classer. Elle a progressé en fonction du développement des connaissances.

Actuellement, les actinobactéries sont classées dans le règne des Procaryotes, le domaine des *Bacteria* ou *Eubacteria* et le phylum *Actinobacteria*, (tel qu'il figure dans le Bergey's manual 2012), lequel renferme cinq classes : *Acidimicrobiia*, *Coriobacteriia*, *Nitriliruptoria*, *Actinobacteria* et *Thermoleophilia*. Ce phylum est, en outre, subdivisé en 15 ordres, 43 familles et 203 genres **(Goodfellow et *al.*, 2012 in Bergey's Manual).**

L'identification des espèces est facilitée par les études physiologiques et moléculaires tandis que les critères morphologiques et chimiques séparent les genres **(Badji, 2006 ; Bendris et *al.*, 2017).**

D'après **Bouras, (2006)** et **Boudjella, (2007)**, les caractères morphologiques contribuent parfois dans la différenciation des genres d'actinobactéries entre eux, parmi les critères :

I.4.1. Critères morphologiques

Les caractères morphologiques sont classés en caractères macromorphologiques et micromorphologiques.

I.4.1.1. Critères macromorphologiques

Ces critères reposent sur une observation à l'œil nu des cultures actinobactériennes poussant sur des milieux de culture **(Agoulmine, 2019).**

- La production ou non d'un mycélium aérien (MA), qui est habituellement plus épais que le mycélium du substrat. Il montre une différenciation suffisante selon laquelle plusieurs isolats peuvent être séparés en un certain nombre de groupes ayant des caractéristiques morphologiques similaires dans des conditions bien précises **(Harir, 2018).**
- La présence ou non de mycélium du substrat (MS), qui possède différentes tailles, forme et épaisseurs. Sa couleur varie de blanc ou pratiquement incolore **(Harir, 2018).**
- La couleur du MA et du MS, est définie à l'aide d'une charte de couleur.
- La production ou non de pigments mélanoïdes.

I.4.1.2. Critères micromorphologiques

Ces critères reposent sur l'observation directe au microscope optique des colonies des actinobactéries poussant sur les milieux de culture. Elle consiste à déterminer :

- La fragmentation ou non du MS et de MA.
- La présence de sporanges sur le MA ou sur le MS.
- La forme et la taille des sporanges et leur agencement : isolées, par deux, par quatre ou en chaînes.
- Le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.
- Le mode de sporulation : spores portées par des sporophores ou mycélium aérien se fragmentant de manière anarchique en spores.
- La présence de spores mobiles ou non mobiles.
- L'ornementation de la surface des spores (lisses, rugueuses, épineuses ou chevelues).
- La formation de structures particulières : synnemata, sclérote **(Boudekique et *al.*, 2016).**

I.4.2. Critères chimiotaxonomiques

La chimiotaxonomie est l'utilisation de la distribution des composants chimiques pour regrouper les organismes en fonction des similitudes de leurs chimies cellulaires.

Les composants chimiques les plus couramment utilisés dans ces systématiques sont les acides aminés de la paroi cellulaire, les lipides, les protéines, les ménaquinones, les types d'acide muramique, la distribution du sucre dans la cellule entière, et la composition de base de l'ADN **(Ait Barka et *al.*, 2016).**

La composition de la paroi des actinobactéries varie fortement d'un groupe à l'autre. Ils n'ont pas de membrane nucléaire et leur paroi cellulaire ne contient ni la chitine ni la cellulose mais une glycoprotéine contenant de la lysine (formes fermentatives) ou de l'acide diaminopimélique (formes oxydatives) **(Mariat et Sebald, 1990 ; Saker, 2015 ; Ounadjela, 2016).**

I.5. Taxonomie de *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* fut créé en **1984 par Labeda et *al.*,** avec comme espèce-type *Saccharothrix australiensis*. Ce genre est caractérisé par sa morphologie, physiologie et son chimiotype **(Bouras, 2005).** Plusieurs espèces de *Saccharothrix* furent décrites quelques années après la création de ce genre, grâce à la taxonomie numérique et moléculaire basée sur le séquençage de l'ADNr 16S et l'hybridation ADN-ADN. Donc le genre *Saccharothrix* appartient au grand groupe des Actinobactéries qui regroupe tous les microorganismes procaryotes de l'ordre des *Actinomycetales* **(Labeda et Kroppenstedt, 2000).**

I.6. Position taxonomique du genre *Saccharothrix*

Le genre *Saccharothrix* était classé dans l'ordre des *Actinomycetal* et à la famille des *Actinosynnemataceae* **(Labeda et Kroppenstedt, 2000).** Mais après les profonds remaniements opérés à l'échelle supragénérique, ce genre est reclassé dans l'ordre des *Pseudonocardiales* et la famille des *Pseudonocardiaceae* **(Manuel de Bergey, 2012).** Il est rattaché au phylum des *Actinobacteria* et à la classe des *Actinobacteria* **(Labeda et *al.*, 2001 ; Labeda et Kroppenstedt, 2006 ; Whitman et *al.*, 2012 ; Benaissa et Boufetta,2018).**

Tableau 1 : Position taxonomique de *Saccharothrix.sp*.

Taxon	Position
Domaine	*Bacteria*
Phylum (Embranchement)	*Actinobacteria*
Classe	*Actinobacteria*
Sous-classe	*Actinobacteridae*
Ordre	*Pseudonocardiales*
Sous-ordre	*Pseudonocardineae*
Famille	*Pseudonocardiaceae*
Genre	*Saccharothrix*
Espèce	*Saccharothrix sp.*

I.7. Caractéristiques du genre *Saccharothrix*

I.7.1. Caractéristiques macromorphologiques et micromorphologiques

La couleur des colonies de *Saccharothrix* diffère selon les espèces, mais la plus abondante est la couleur blanche clairsemée, blanc Jaunâtre ou jaune orange.

Le mycélium de substrat de ce genre est ramifié, dressé et strié, et les colonies portent souvent un mycélium aérien, qui est très peu produit ou abondant selon les espèces. La fragmentation des filaments mycéliens est anarchique, souvent en « zig-zag », produisant de longues chaînes de spores. Ces derniers sont non mobiles, en bâtonnets (1 à 2 µm x 0,7 à 1 µm) ou ovoïdes. À la différence des *Streptomyces*, le genre *Saccharothrix* ne produit pas de sporophores. Le mycélium du substrat se fragmente en éléments allongés ou coccoïdes, une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre *Streptomyces*, est illustrée dans la figure 1 **(Bouras, 2005 ; Hamdar, 2018).**

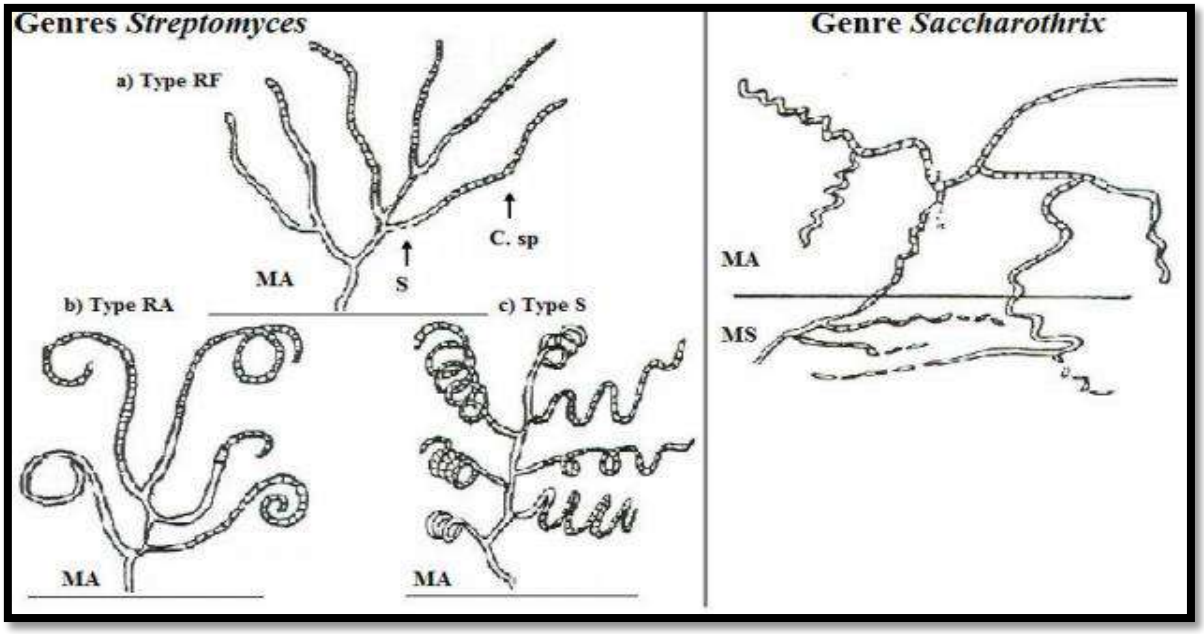

Figure 1 : Une comparaison de la micromorphologie du genre *Saccharothrix* avec celle du genre d'actinomycète le plus abondant dans la nature, *Streptomyces* (Bergy, 1989). MA, mycélium aérien ; MS, mycélium du substrat ; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuse) ; RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées) ; S, *Spira* (Chaînes spiralées) ; s, sporophore ; c.sp, chaînes de spores.

I.7.2. Caractéristiques chimiotaxonomiques et physiologiques

Le genre *Saccharothrix* est morphologiquement similaire au genre *Nocardiopsis*, il se distingue par son chimiotype et ses constituants cellulaires **(Labeda et Kroppenstedt, 2000)** :

- La paroi cellulaire de type III E (présence d'acide méso-diaminopimélique sans glycine).
- La présence de deux types de ménaquinones (lipides membranaires) : MK-9 (H4) ou MK-10 (H4), constituées d'un noyau quinone méthylé et d'une chaîne carbonée aliphatique formée de neuf à dix unités isoprènes dont quatre sont hydrogénées.
- La présence de deux types de phospholipides membranaires composés de phosphatidyléthanolamine et d'hydroxy-phosphatidyléthanolamine avec ou sans glucosamine (type P II ou P IV, respectivement).
- La présence de trois sucres caractéristiques (dans les cellules entières) : le galactose, le rhamnose et le mannose.
- L'absence d'acides mycoliques pariétaux et de glycine.
- La L-alanine, la Dalanine, l'acide glutamique, l'acide muramique peuvent être, aussi, présents **(Zerizer, 2014).**

- Toutes les espèces du genre *Saccharothrix* sont aérobies strictes, catalase et uréase positives, résistantes aux lysozymes **(Labeda et *al.*, 1984 ; Zerizer, 2014).**
- L'intervalle de la température de croissance est de 10 jusqu'à 45 °C, l'optimum est généralement à 30 °C.
- L'intervalle de pH est de 4 à 10, l'optimum est au tour de 7 **(Kim et *al.*, 2011).** L'optimum de la concentration en NaCl, pour la plupart des espèces, est dans l'intervalle de 4-5 %**(Labeda et Lechevalier, 1989 ; Otoguro et *al.*, 2009 ;Zerizer, 2014).**

I.8. Espèces appartenant au genre *Saccharothrix*

Quelques années après la création de ce genre, plusieurs espèces de *Saccharothrix* furent découvertes **(Labeda et Lechevalier, 1989 ; Labeda et Lyons, 1989).** Quelques isolats appartenant au genre *Nocardiopsis* et aux d'autres genres, furent reclassés parmi les *Saccharothrix* **(Grund et Kroppenstedt, 1990)**, mais ce genre a connu également plusieurs remaniements, et plusieurs isolats de *Saccharothrix* ont été transférés vers d'autres genres. Actuellement, le genre *Saccharothrix* compte 23 espèces parmi ces derniers sont montrés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Espèces du genre *Saccharothrix*, d'après le National Center for Biotechnology Information **(NCBI, http://www.ncbi.nlm.nih.gov /Taxonomy)** ; **(Hamdar.A ,2018).**

Espèce	Numéros d'accès dans les collections	Références
Saccharothrix algeriensis	NRRL B-24137, NBRC 101915, JCM 13242, DSM 44581	**(Zitouni et *al.*, 2004 b).**
Saccharothrix australiensis	NRRL 11239, NBRC 14444, JCM 3370, DSM 43800, ATCC 31497, IFO 14444, VKM Ac-894	**(Labeda et *al.*, 1984).**
Saccharothrix ecbatanensis	DSM 45486, UTMC 00537, CCUG 63021	**(Hamedi et *al.*, 2015).**
Saccharothrix ghardaiensis	DSM 46886, CECT 9046	**(Bouznada et *al.*, 2017).**
Saccharothrix hoggarensis	DSM 45457, CCUG 60214	**(Boubetra et *al.*, 2013b).**
Saccharothrix isguenensis	DSM 46885, CECT 9045	**(Bouznada et *al.*, 2016).**
Saccharothrix mutabilis subsp. Mutabilis	NRRL B-16077, ATCC 31520, DSM 43853, IFO 14310, IFM 240	**(Labeda et Lechevalier, 1989).**
Saccharothrix saharensis	DSM45456, CCUG 60213	**(Boubetra et *al.*, 2013a).**
Saccharothrix tamanrassetensis	DSM 45947, CECT 8640	**(Boubetra et *al.*, 2015).**

I.9. Métabolites secondaires sécrétés par *Saccharothrix*

Le métabolisme des actinobactéries peut être divisé en deux parties : le métabolisme primaire et secondaire. Le métabolisme primaire regroupe les réactions cataboliques et anaboliques qui permettent la formation de biomasse, le pouvoir réducteur et l'énergie produits par ces réactions sont utilisés pour former et assembler les monomères (ex : acides aminés) en macromolécules (ex : protéine). Ces bactéries filamenteuses sont connues par la richesse de leur métabolisme secondaire, ce métabolisme regroupe les voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonction apparente dans le métabolisme cellulaire. Les gènes impliqués dans la biosynthèse et dans la résistance des antibiotiques sont regroupés en clusters dont l'expression est finement régulée **(Strub, 2008).**

Le genre *Saccharothrix* sécrète plusieurs antibiotiques dont leur nature chimique est assez diversifiée (Tableau 03), certains sont doués d'une activité antibactérienne (Gram positif et plus rarement Gram négatif), et d'autre d'une activité antifongique, ou encore antibactérienne et antifongique à la fois. D'autres composés présentent des activités antitumorales, antivirales, herbicides ou inhibitrices de métalloprotéases ou d'autres enzymes.

Tableau 3 : Les principales substances bioactives ayant une activité biologique et synthétisées par les souches appartenant au genre *Saccharothrix* **(Bouras, 2005).**

Substances	Propriétés	Origines	Références
ThiazoIiIpyridine	Antifongique	*Saccharothrix sp.*	**Sugawara et *al.*, 1999.**
Ammocidine	Antitumorale	*Saccharothrix sp.*	**Murakami et *al.*, 2001 a, b.**
Coformycine	Herbicide	*Saccharothrix sp.*	**Bush et *al.*, 1993 ; Dancer et *al.*, 1997.**
Fluvirucines (Al, A2, BI, B2, B3, B4 et B5)	Antivirales	*Sa.mutabilis subsp. Schiiijamaensis*	**Tomita et *al.*, 1991.**
Dithiolopyrrolones (AJ, Ct, C2, A et B)	Antibactériennes, antifongiques	*Sa. Algeriensis*	**Lamari et *al.*, 2002 a, b.**
Pravastatine	Anticholestérolémique	*Sa. mutabilis*	**Matsuo et *al.*, 2003.**
Swalpamycin B	Antibactérienne	*Saccharothrix sp.*	**Zitouni 2004a.**
Aldgamycin G	Antibactérienne	*Saccharothrix sp.*	**Zitouni 2004a.**
TMC 96	Inhibiteur de protéasome	*Saccharothrix sp.*	**Koguchi et *al.*, 1999.**

Chapitre II
Les antibiotiques

II.1.Définition des antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire **(Coates et Hu, 2007 ; Merizig, 2015).**

Le terme désigne toute substance naturelle ou synthétique qui détruisent ou bloquent la croissance des bactéries **(Veyssiere, 2019).** Dans la majorité des cas, leur synthèse débute à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et le début de la phase stationnaire (idiophase) **(loucif, 2006).** Un antibiotique est caractérisé par son spectre d'action, et son efficacité à une très faible dose, et ce par l'inhibition de certains processus vitaux **(Belyagoubi, 2014).** De plus, afin qu'il soit actif, il doit pénétrer dans la bactérie, sans être détruit ni être modifié, se fixer sur une cible et perturber la physiologie bactérienne **(Merniez, 2018).**

Il a été signalé que plus de 70% des antibiotiques d'origine naturelle ont été isolés de différents genres d'actinobactéries. Ainsi, il a été suggéré qu'un grand nombre d'actinobactéries pourraient être encore inconnues et produire des antibiotiques **(Pandey, 2018).**

II.2.Classification des antibiotiques

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification **(Smaoui, 2010)**, qui facilitera le choix thérapeutique. Ci-après les critères retenus :

- Origine : élaboré par un organisme (naturel), synthétique ou semi synthétique **(Koussa, 2019).**
- Spectre d'action : peut-être large ou étroit.
- Type d'action : peut-être bactériostatique, fongistatique, bactéricide, ou fongicide.
- Nature chimique : les antibiotiques ayant la même structure chimique, sont classés dans une même famille.

Tableau 4 : Les principaux antibiotiques et leur classification **(Joffin et Leyral, 2014).**

Famille	Antibiotiques	Spectre d'action
Aminosides	Streptomycine, Kanamycine, Gentamycine, Gobramycine, Amikacine.	Large (bacilles à gram négatif, certaines bacilles à gram positif).
B-lactamines	Pénicilline G	Etroit (cocci à gram positif et à gram négatif).
	Pénicilline V Pipéracilline	Etroit (bacilles à gram positif). Large (bacilles à gram négatif).
Tétracyclines	Tétracycline, Minocycline, Doxyciciline	Large (gram négatif, gram positif).
Phénicoles	Chloramphénicol Thiamphénicol	Large (gram négatif, gram positif).
Sulfamides	Sulfadiazine, Sulfamaxole, Sulfaméthaxazole.	Large (gram négatif, gram positif).
Diminopyrimidines	Triméthoprime	Large (gram négatif, gram positif).
Quinolones	Acide nalidixique Enoxacine	Etroit (bacille à gram négatif). Large (gram négatif et positif).

II.3.Microorganismes producteurs d'antibiotique

La grande majorité des antibiotiques est produite par des microorganismes. Parmi ces microorganismes, les bactéries (y compris les actinobactéries) sont responsables d'environ 74% de la production. Parmi les molécules élaborées par les actinobactéries, seul 20% sont des antifongiques, les 80% restantes ont des activités biologiques diverses : antibactériennes (Surtout), antivirales, antitumorales, antiprotozoaires, ou insecticides. Les bactéries non mycéliennes, en dehors des actinobactéries, produisent environ 17% des antibiotiques d'origine microbienne **(Lazzarini et *al.*, 2001 ; Tiwari et Gupta, 2011 ; Boubetra, 2013)** et qui sont sécrétés surtout par les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*. D'autres bactéries appartenant à des genres variés tels que *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Proteus*, etc, produisent également quelques antibiotiques **(Breton et *al.*, 1989).**

Les champignons producteurs sont à l'origine d'environ 22% de la production, dont les genres *aspergillus*, *fusarium*, *penicillium*, *trichoderma* et *coleophoma* (champignons imparfaits, ascomycètes) et aussi certains basidiomycètes et zygomycètes **(Laskin et Lechevalier, 1984 ; Barrett, 2002 ; Boubetra, 2013).**

II.4.Biosynthèse des antibiotiques

Les microorganismes produisent leur métabolite secondaire lors de la phase stationnaire **(Tortora et *al.*, 2003).** En effet, cette production n'est indispensable ni à la croissance, ni aux besoins énergétiques des organismes producteurs. Il est, par ailleurs, possible d'obtenir un couplage de la production de certains métabolites secondaires et la croissance contrôlée du microorganisme en faisant varier la composition du milieu **(Bouras, 2005).**

Les antibiotiques naturels sont synthétisés chimiquement à partir des acides gras, acides aminés, des bases pyrimidiques et puriques issus du métabolisme primaire. Ainsi, ses variétés structurales résultent des chaines de réactions enzymatiques telles que la méthylation, polymérisation, réduction et oxydation. Du point de vue génétique, les gènes codants sont regroupés sous forme de cluster dans l'ADN génomique, et parfois dans des plasmides. Généralement 10 à 15 gènes sont nécessaires pour synthétiser une molécule d'antibiotique, alors qu'un seul gène peut encoder une protéine de 100 Kda **(Merrouche, 2012).**

Cette biosynthèse se déroule en présence des usines cellulaires (biomasse), des précurseurs et des enzymes actives capables de transformer ces dernières. La dite biosynthèse est soumise à tout un ensemble de mécanismes de régulation intervenant aux niveaux anabolique, catabolique et énergétique de la cellule. Elle est affectée par les conditions physicochimiques et nutritionnelles dans lesquelles le microorganisme se développe **(Bouras, 2005).**

II.5.Régulation de la biosynthèse des antibiotiques

La régulation de la production microbienne des antibiotiques peut s'exercer directement et spécifiquement sur les gènes des enzymes de synthèse des métabolites secondaires et/ou indirectement sur les voies de biosynthèse des métabolites primaires « précurseurs » **(Piret et Demain, 1988 ; Demain, 1998 ; Benaissa et Boufetta, 2018).** Elle est contrôlée par des facteurs environnementaux et des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate, la quantité et la qualité des sels minéraux et les oligoéléments. Ces facteurs ont une importance cruciale dans l'induction et répression de la biosynthèse des antibiotiques par une rétro-inhibition et inactivation enzymatique **(Bouras, 2005 ; Merrouche, 2012).**

II.5.1. Facteurs physico-chimiques

L'influence des facteurs physico-chimiques tels que le PH, la température, agitation et aération jouent un rôle primordial dans l'amélioration du rendement de la biosynthèse des antibiotiques.

Le PH a un impact significatif sur la cinétique de croissance des micro-organismes comme activités enzymatiques **(Elmahdi et *al.*, 2003 ; Rafieenia,2013).** D'une manière générale, la production d'antibiotiques est optimale à pH légèrement basique **(Wang et *al.*, 2010; Oskay, 2011).** Ainsi **Lamari (2006)** a indiqué que $CaCO_3$ ajouté au milieu de culture joue un rôle d'un tampon, qui ajuste les changements du ph et favorise alors la production des antibiotiques.

La température affecte fortement la croissance et la productivité d'une souche qu'elle s'agit d'une souche mésophile, thermophile ou psychrophile **(Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997 ; Lu et *al.*, 2019).** Les températures optimales pour la production sont situées dans des plages souvent étroites et plus basses que pour la croissance **(Larpent et Sanglier, 1989 ; Arab et Kabaz, 2018).**

La vitesse d'agitation est un facteur pouvant influer sur la morphologie, la croissance des actinobactéries ainsi sur la production des antibiotiques. L'agitation peut améliorer l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production des métabolites secondaires **(Smaoui, 2010 ; Wadetwar et *al.*, 2013 ; van Dissel et van Wezel, 2017).**

Le temps d'incubation est un facteur qui affecte la synthèse des métabolites secondaires des actinobactéries. Chez le genre *Saccharothrix*, le temps d'incubation varie d'une espèce à une autre, voire même d'une souche à une autre. Par exemple la souche *Saccharothrix algeriensis* commence la production des biomolécules après 2 jours d'incubation et atteint un maximum de production après le 4 ème jour **(Lamari et *al.*, 2002a).** Par contre, la souche *Saccharothrix sp.*SA 103 produit des métabolites antibactériens dès le premier jour et atteint un maximum de production après le 4 ème jour **(Zitouni et *al.*, 2004a ; Bezari et Ouali, 2016).**

II.5.2. Inoculum

L'Inoculum est l'ensemble de la biomasse (spores, cellules et hyphes) nécessaire pour ensemencer le milieu de culture par la souche étudiée **(Delaunay et *al.*, 2003 ; Tata, 2020),** en contrôlant les paramètres relatifs à chaque production d'antibiotiques.

Ces paramètres sont :

- L'âge de la souche, laquelle doit être bien conservée pour conduire à une concentration élevée en cellules au milieu de culture. Aussi, il vaut mieux utiliser les pelotes de mycélium ouvertes, car elles conduisent à une forte diffusion de substrat.
- La quantité de l'inoculum, est importante afin de choisir le meilleur volume a prélevé à partir de la culture mère. Car une faible densité d'inoculum peut réduire la charge de la

nappe microbienne ainsi la formation du produit, tandis qu'une forte densité d'inoculum peut entraîner une mauvaise production de l'antibiotique.

- La qualité de l'inoculum. Celle-ci est déterminée par ses propriétés physico-chimiques, sans omettre de prendre en compte les caractères morphologiques des actinobactéries. Aussi, il y'a lieu de s'assurer d'une activité respiratoire maximale de l'inoculum, devant conduire à une production maximale d'antibiotique recherchée **(Bouras, 2005 ; Merrouche, 2012).**

II.5.3. Facteurs nutritionnels

La nature et la concentration de certains composants du milieu de culture ont un effet notable sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs chez les actinobactéries **(Gesheva et *al.*, 2005 ; Ben Mahrez et Ikhlef, 2015).**

Parmi les sources nutritionnelles, celles de carbone, d'azote, de phosphate, et les oligoéléments qui jouent un rôle important dans cette production. La diminution de ces sources nutritionnelles pourrait lancer l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments **(Martin et Demain ,1980 ; Strub, 2008 ; Afroune et Barache, 2014).**

Le carbone est un élément structural des cellules microbiennes et aussi une source d'énergie. Le choix de cette source influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques **(Doull et Vining, 1990 ; Spizek et Tichy, 1995 ; Awad, 2005).** La source carbonée peut être simple ou complexe et son effet dépend de la souche cultivée, de la concentration, du temps d'addition, de la composition du milieu de culture (synthétique ou complexe), et du nombre de sources de carbone ajoutées **(Singh et Rai, 2012 ; Ababutain et *al.*, 2013 ; Rafieenia, 2013 ; Souagui et *al.*, 2015).**

Quant aux sources d'azote, essentielles dans la structure des antibiotiques **(Lebrihi et *al.*, 1992 ; Khaliq et al., 2013).** Elles sont inorganiques (sels d'ammonium, nitrates) et considérées comme des sources rapidement assimilables, bénéfiques pour la croissance des microorganismes **(Manikkam et *al.*, 2015),** mais entrainant une faible production des métabolites secondaires. En revanche, les sources d'azote organiques simples ou complexes (acides aminés, extrait de levure, peptone, tryptone, caséine) sont des sources d'azote durables, bénéfiques pour la croissance ainsi que l'accumulation régulière des métabolites **(Baoxin et *al.*, 2011).** Dans le cas de nombreux métabolites, la production est meilleure lorsque la source d'azote est organique.

Plusieurs travaux ont montré l'implication d'autres sources nutritionnelles dans la production des antibiotiques. Il s'agit des éléments minéraux comme le phosphore le magnésium et le potassium, ainsi que les oligoéléments (Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo et Mn) qui sont utilisés comme des cofacteurs pour la croissance des microorganismes à des concentrations très faibles **(Laprent et Sanglier, 1989 ; Laprent et Sanglier, 1992 ; Strub, 2008).**

II.6. Mécanisme d'action des antibiotiques

La fixation de l'antibiotique sur son hôte d'action au niveau de la cellule entraine l'inhibition spécifique d'une ou plusieurs étapes métaboliques précises. Certains antibiotiques empêchent la synthèse de la paroi, d'autres la synthèse de la membrane plasmique, celle des acides protéiques ou encore celle des acides nucléiques.

Les antibiotiques qui agissant au niveau de la paroi (exemple : β-lactamines) inhibent la synthèse pariétale bactérienne en empêchant l'intégration des acides aminés constituant la muréine (composant essentiel de la paroi bactérienne, qui confère à la bactérie sa forme et sa rigidité ce qui lui permet de résister à la forte pression osmotique intra-cytoplasmique). La bactérie alors n'est plus protégée contre la pression osmotique ce qui entraine la lyse de cette cellule bactérienne **(Lalaoui, 2012).**

D'autres antibiotiques ayant une action sur la membrane plasmique comme les polymyxines altèrent la membrane bactérienne en provoquant la formation de pores laissant échapper le contenu cellulaire **(Prescott, 2002 ; Yoneyema et Katsumata, 2006 ; Arab et Kabaz, 2018),** et en désorganisant la structure et le fonctionnement de la membrane, ce qui produit des graves troubles d'échanges électrolytiques avec le milieu extérieur.

Les antibiotiques ayant aussi une action sur les unités ribosomales qui inhibent la synthèse des protéines (exemple : chloramphénicol). Ces antibiotiques peuvent empêcher la fixation de l'ARN porteur d'acides aminés, soit la translocation et la transpeptidation ou encore ils peuvent provoquer des erreurs de lecture du code génétique **(Asselineau et Zalta, 1973 ; Agoulmine, 2019).**

Les molécules antibiotiques ont une action sur la synthèse des acides nucléiques, et inhibent l'ARN polymérase comme les ansamycines, l'ADN gyrase (indispensable à l'ouverture de la double hélice et donc à la réplication de la cellule), la topoisomérase II et la topoisomérase IV (exemple : les quinolones et fluoroquinolones). Ainsi ils ont un effet sur la formation de l'acide folique qui est essentiel à la synthèse des acides nucléiques (exemple : sulfamides et triméthoprime) **(Asselineau et Zalta, 1973 ; Gewirtz, 1999 ; Tata, 2020).**

II.6.Résistance aux antibiotiques

Une souche est dite résistante lorsqu'elle se cultive en présence d'une concentration d'antibiotique beaucoup plus élevée que celle qui inhibe le développement de la majorité des autres souches de la même espèce **(Sylvie Carle, 2009).**

Un antibiotique n'est efficace que lorsqu'il rentre en contact avec la bactérie, puis pénétré dans la cellule afin de perturber le fonctionnement vital du microorganisme en se fixant à une cible sans être détruit et modifié **(Collignon et al., 2016).** La résistance aux antibiotiques peut être naturelle ou acquise.

La résistance naturelle est un caractère d'espèce qui touche toutes les bactéries de l'espèce considérée. Elle est stable, transmise à la descendance (elle a pour support génétique le chromosome bactérien) mais elle n'est pas ou peu transmissible sur un mode horizontal (d'une bactérie à l'autre au sein d'une même espèce ou entre espèces différentes) **(Lozniewski et *al.*, 2010).**

A côté de la résistance naturelle existe aussi des résistances acquises ; il s'agit d'un caractère qui ne concerne alors que quelques (ou parfois de nombreuses) souches d'une espèce donnée. La résistance acquise est moins stable, mais elle se propage souvent de façon importante dans le monde bactérien, elle résulte d'une modification génétique de la bactérie **(Lozniewski et *al.*, 2010 ; Collignon et al., 2016).** Cette résistance peut être obtenue soit par mutation chromosomique (des mutations spontanées ; 20% des cas), ou par la mutation plasmidique (échange par conjugaison d'un plasmide ou d'un transposon ; 80% des cas) **(Ghannoum et Rice, 1999 ; Maltezou, 2008 ; Tata, 2020).**

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être :

- Enzymatiques (les bactéries peuvent synthétiser des enzymes capables d'inactiver les antibiotiques en les détruisant ou en les modifiant par hydrolyse, par transfert de groupements chimiques ou par oxydoréduction).
- Non-enzymatiques (modification de la perméabilité membranaire, système d'efflux bactérien ; ce mécanisme repose sur l'expulsion des antibiotiques hors de la cellule bactérienne, la modification de la cible de l'antibiotique ou bien sur la formation de biofilms) **(Cavallo et *al.*, 2004 ; Arab et Kabaz, 2018).**

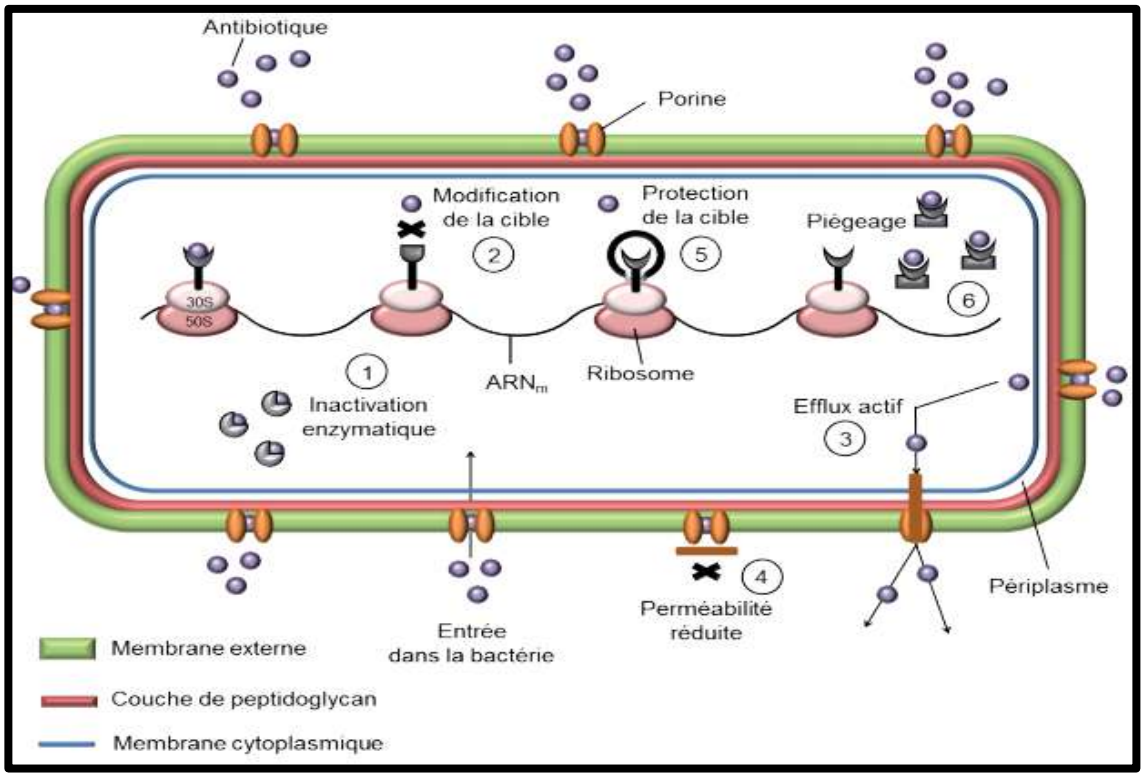

Figure 2: Différents mécanismes de résistance aux antibiotiques retrouvés chez les bactéries **(Guardabassi et Courvalin, 2006 ; Muylaert et Mainil, 2012).**

Deuxième partie
Partie expérimentale

Chapitre III
Matériels et méthodes

III.1. Lieu de stage

Notre travail a été réalisé au niveau du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) d'Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger, ce laboratoire est spécialisée pour :

- Les Actinobactéries et les Antibiotiques à Intérêt Médical et Vétérinaire.
- Champignons Toxinogènes et les mycotoxine.
- Les Microorganismes, les Antibiotiques et les Biomolécules d'Intérêt Agronomique.
- Taxonomie des Actinobactéries des Ecosystèmes Sahariens et Potentialités Antagonistes.

Nous avons réalisé toutes les manipulations de notre thématique qui inclut dans un axe de recherche du laboratoire LBSM (actinobacteries et antibiotiques). Le travail a duré une période de deux mois (juillet et aout) de l'année 2019.

III.2. Matériel

III.2.1. Matériel non biologique

Le matériel non biologique utilisé dans cette étude est : shaker, PH mètre, centrifugeuse, milieux des cultures et les autres matérielles utilisées sont résumé dans l'annexe 1.

III.2.2. Matériel biologique

III.2.2.1. La souche AHO23 de S*accharothrix*

La souche d'actinobactérie notée AHO23 étudiée dans ce travail appartient à la collection du Laboratoire de Microbiologie Appliquée (LBSM) de l'école normale supérieure de Kouba. Elle a été isolée par le doctorant chercheur SAADI en 2016 à partir des sols sahariens de la région de Tamanrasset (Ahaggar stastion d'olivier).

III.2.2.2. Germes cibles utilisés

La recherche a été effectuée pour l'obtention des molécules antimicrobiennes intéressantes de la souche AHO23, contre divers germes cibles. Comme les bactéries, il est aussi intéressant d'utiliser des champignons.

Les microorganismes cibles utilisés dans cette étude proviennent, respectivement, de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens(LBSM) de Kouba-Alger, ils sont conservés à 4 °C sur milieu semi solide Mueller Hinton pour les bactéries, et le milieu PDA pour les champignons.

Les germes cibles utilisés pour évaluer les propriétés antagonistes, et pour tester l'activité antimicrobienne de la souche AHO23 sont résumés dans l'annexe 4.

III.3.METHODES

III.3.1. Identification de la souche AHO23

III.3.1.1. Étude morphologique

L'observation macromorphologique et micromorphologique des colonies, de la souche AHO23 poussant sur différents milieux de culture, nous a permis de déterminer les caractéristiques culturales et micromorphologiques d'isolats d'actinobactérie.

Les caractéristiques macromorphologiques sont déterminées sur différents milieux de culture solides : ISP2 et ISP4 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966),** ainsi que sur le milieu CHV **(Waksman, 1961).** La composition des milieux de culture est donnée dans l'annexe1.

Cette étude sert à noter, aux 12ème, 14 jours d'incubation à 30 °C, la croissance de la souche, l'aspect et la couleur des mycéliums aériens et du substrat, ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles (s'ils sont sécrétés) dans les différents milieux.

Les différentes couleurs sont définies à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Chart illustrated with Centroïd Color ISCC-NBS).

De même, les différentes souches (poussant sur les mêmes milieux de culture cités précédemment) ont fait l'objet d'une observation microscopique à l'aide d'un microscope optique Zeiss, à deux grossissements (x100 et x400). Ces observations ont été réalisées directement sur les cultures poussant sur les milieux coulés en boîtes de Pétri, et ce, afin d'étudier la structure des mycéliums et des fructifications sans avoir à les altérer.

Cette étude est indispensable pour la reconnaissance des genres. Elle consiste à observer la sporulation du mycélium aérien, la forme et l'arrangement des spores ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

III.3.1.2. Étude physiologique

Dans cette étude, une série de tests physiologiques a été réalisée. D'après **Whitman *et al.* (2012) (*in* : Bergey's manual, 2012),** ces tests sont ceux qui discriminent les espèces appartenant aux mêmes genres. La composition chimique de tous les milieux de culture utilisés, ainsi que les méthodes effectuées lors de l'étude physiologique sont détaillées en annexe 2.

III.3.1.2.1. Utilisation des composés glucidiques

Ce test a pour objectif d'apprécier la croissance de chaque souche en présence de vingt composés glucidiques dont chacun est ajouté au milieu de base comme étant la seule source de

carbone. Le milieu de base utilisé dans ce test est celui préconisé par **Gordon *et al.* (1974)** (voir annexe 2).

III.3.1.2.2. Utilisation de divers autres composés organiques

L'hydrolyse ou non de certains composés organiques a été également testée pour chacune de nos souches. Ces tests sont effectués selon la méthode de **Gordon *et al.* (1974)** pour l'utilisation de l'adénine, de la caséine du lait, de la guanine, de l'hypoxanthine, de la tyrosine et de la xanthine ; la méthode de **Marchal et Bourdon (1973)** pour l'hydrolyse de l'amidon et de la gélatine ; la méthode de **Marchal *et al.* (1987)** pour la dégradation de l'esculine et de l'arbutine ; et la méthode de **Sierra (1957)** pour la dégradation du Tween 80. Chacune de ces méthodes est donnée avec plus de détails en annexe 2.

Les acides organiques, utilisés sous forme de sels de sodium, sont ajoutés à raison de 2 g/L au milieu de base contenant le rouge de phénol à 0,12 % et à PH 6,8 (milieu coloré en jaune).

III.3.1.2.3. Production de nitrate réductase

La production de la nitrate réductase est mise en évidence sur un bouillon nitraté **(Marchal *et al.*, 1987)** (composition dans l'annexe 2) contenu dans des tubes à vis, à raison de 5 mL par tube. Pour chaque souche, l'ensemencement est réalisé en double. La lecture se fait après 5 à 10 jours d'incubation à 30 °C, et ce, en ajoutant de manière successive 5 gouttes de chaque réactif : Griess I puis Griess II.

Un résultat positif se traduit par l'apparition d'une couleur rose rougeâtre dans le milieu de culture. Si la couleur ne change pas, une petite quantité de poudre de zinc y est ajoutée.

III.3.1.2.4. Production de pigments mélanoïdes

La production de pigments mélanoïdes diffusibles (brun-noirâtre à noir-brunâtre) par chacune de nos souches a été mise en évidence sur les milieux ISP 6 et ISP 7 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)** (composition dans l'annexe 2). Les résultats sont appréciés après 24 et 48 h d'incubation en comparaison avec le milieu témoin non ensemencé, mais incubés dans les mêmes conditions.

III.3.1.3. Identification moléculaire

III.3.1.3.1. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et phylogénie (pour la souche AHO23)

Cette étude a pour but d'extraire et d'amplifier par PCR (Polymerase Chain Reaction) le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S en vue de déterminer sa séquence. Une fois déterminée, cette dernière est comparée avec celles des espèces de références après alignement automatique (méthode du blast), en utilisant un logiciel qui permettra d'obtenir les pourcentages de similarités et de déterminer ainsi les espèces les plus proches de nos souches.

L'autre partie des souches a été séquencée au Laboratoire de Microbiologie de la "German Collection of Microorganisms and Cell Cultures (DSMZ)", Braunschweig (Allemagne). Les étapes suivies lors de la PCR sont décrites dans l'annexe 2.

III.3.1.3.2 Analyses phylogénétiques

L'utilisation du logiciel MEGA 7.0 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis, version 7.00) **(Tamura *et al.*, 2016)** nous a permis d'aligner les séquences des souches obtenues avec les séquences de références. L'ensemble des données alignées est analysé phylogénétiquement afin de générer les matrices de distance évolutive comme décrit par **Jukes et Cantor (1969).** Plusieurs arbres phylogénétiques ont été construits dans cette étude, sur la base des séquences nucléotidiques des gènes codant pour l'ARNr 16S.

Pour toutes les souches, un arbre phylogénétique a été déduit par la méthode du Neighbor-Joining **(Saitou et Nei, 1987).** Dans le cadre de la description de nouvelles espèces, la méthode du Maximum-Likelihood **(Felsenstein, 1981)** et celle du Maximum-Parcimony (Fitch, 1977) ont été utilisées en supplément à celle du Neighbor-Joining. Les nœuds communs aux trois techniques sont indiqués par un astérisque. La robustesse des nœuds a été évaluée statistiquement par la méthode du "bootstrap" dont les valeurs sont basées sur le résultat de 1000 rééchantillonnages **(Felsenstein, 1985).**

III.3.2 Production des antibiotiques par la souche AHO23

III.3.2.1.Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche AHO23 sur milieu solide

III.3.2.1.1. Préparation de culture de la souche AHO23

Des boîtes à pétries contenant différents milieux de culture solide (ISP2/MS/MSS) avec différentes sources de carbone sont ensemencées par la souche AHO23 en stries serrées et

incubées à 30°C pendant 10 jours dans le but d'avoir une meilleure croissance, sporulation et production des substances antimicrobiennes.

III.3.2.1.2. Préparation des suspensions des germes cibles

Afin d'évaluer les propriétés antagonistes, et tester l'activité antibactérienne et antifongique de la souche AHO23, des suspensions des germes cibles ont été préparées.

Pour chaque germe cible, une solution mère a été préparée par l'inoculation d'une fraction de ces germes dans 9ml d'eau distillée stérile, ensuite homogénéisée à l'aide d'un vortex. Effectuer des ensemencements par des stries serrées, Puis les incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les champignons, pour obtenir une nappe microbienne.

Et pour le test d'activité, la suspension préparée est conservée à 4°C, après introduite avec un volume donné dans le milieu de culture semi-solide ISP2 avec une bonne agitation et puis couler les boites.

III.3.2.1.3. Test d'antagonisme « Méthode des cylindres d'agar »

Ce test est appliqué pour désigner la situation où un organisme exerce un effet inhibiteur sur autre organisme qu'il tend à éliminer sans le consommer.

La souche *"Saccharothrix"* a été ensemencée en stries serrées à la surface des milieux de différentes sources de carbone (ISP2/MS/MSS) afin de former un tapis homogène avec une bonne sporulation. Après incubation à 37°C durant une période donnée, des cylindres d'agar de 10mm de diamètre ont été réalisés à l'aide des emporte-pièce en verre stérile, puis prélevés par une pince stérile pour être déposés à la surface des milieux semi-solides ISP2 pré-ensemencés par les germes cibles préalablement cités . Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées pour permettre la diffusion des substances actives antimicrobiennes et en inhibant momentanément la croissance des germes cibles, ces dernières sont incubées à 37°C pendant 24h pour les bactéries et à 25°C pendant 48h pour les champignons. Des zones d'inhibition ont été observées autour des disques de la souche AHO23 produisant des substances actives contre le germe test, et le diamètre d'inhibition est mesuré en millimètre, moyennant une règle graduée. Plus la zone claire autour des disques d'agar est grande, plus l'activité antimicrobienne est importante, signifie que ces bactéries produisent des molécules antimicrobiennes capables de stopper la croissance des germes tests, alors que l'absence de cette zone, indique un résultat négatif qui montre que les germes cibles utilisés sont résistantes aux substances produites par cette souche.

Les souches présentant un pouvoir antagoniste et une bonne activité vis-à-vis des germes cibles seront sélectionnées dans le but de déterminer le meilleur milieu d'activité antagoniste pour la suite du travail.

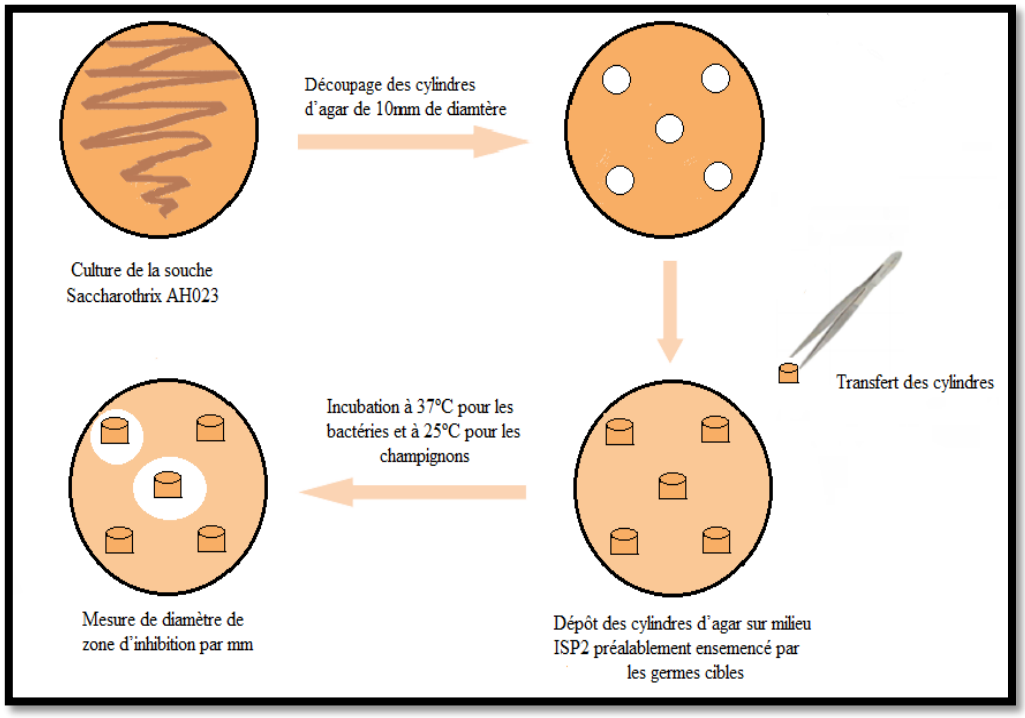

Figure 3: Activité antagoniste de la souche AHO23 vis-à-vis des germes cibles sur milieu ISP2 par la méthode des cylindres d'agar.

III.3.2.2. Cinétique de PH, de croissance et de la production des antibiotiques par la souche AHO23 en milieu liquide

La cinétique de croissance et de production des antibiotiques par la souche AHO23 consiste le suivie des bactéries survivantes à partir de bouillons contenant l'antibiotique à étudier, par l'analyse d'évolution des variations du PH et la mesure du poids sec, dynamiquement au cours du temps.

III.3.2.2.1. Préparation de l'inoculum de la souche AHO23

Inoculum est déterminé par la qualité et la quantité conservée de la biomasse (que ce soit des cellules, spores ou mycélium) introduite par inoculation, Car ces 2 concepts sont nécessaires pour achever le succès d'une bonne production des substances actifs.

La souche étudiée AHO23 est ensemencée en stries serrées sur le milieu solide ISP2 **(Shirling et Gottlieb, 1966**), ce milieu gélosé est utilisé pour la préparation des pré-cultures de la souche. Les boîtes de pétri sont incubées pendant 10 jours, de façon à obtenir une culture mûre d'une bonne croissance et sporulation de la souche.

III.3.2.2.2. Préparation des pré-cultures

Les pré-cultures sont effectuées dans des fioles d'erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture liquide (ISP2/MS/MSS). A Chaque erlenmeyer de MS et de MSS sont ajoutées d'une source de carbone soit (glucose, glycérol, amidon, saccharose ou dextrine).

Á l'aide d'un emporte-pièce métallique et stérile, ces fioles sont inoculées par des spores et des fragments mycéliens de la souche AHO23, qu'elles sont recueillies à partir des cultures âgées de 10 jours sur milieu ISP2 solide. L'âge de la pré-culture affecte également la production et ça s'explique par des expériences menées sur l'effet de l'âge de la préculture, qui ont montrés que les inocula âgés de 24h à 48h conduisaient, à l'obtention d'une bonne reproductibilité, alors que des pré-cultures plus âgées ont donné des rendements plus faibles.
Les pré-cultures sont ensuite incubées à 30°C dans un shaker (New Brunswick Scientific) sous une agitation à 250 rpm pendant 2 à 3 jours.

III.3.2.2.3. Milieux de cultures utilisés

D'après **Bourass et *al.*, 2006**, trois milieux de culture sont recommandés :

- **ISP2 (International *Streptomyces* Project 2)**

C'est un milieu liquide de sporulation pour la croissance et notamment pour la conservation bactérienne. Il est composé de : 4g du glucose, 4g d'extrait de levure et 10g d'extrait de malt.

- **MS (Milieu synthétique)**

C'est un milieu relativement pauvre constitué de substances chimiques pures, sa composition qualitative et quantitative est rigoureusement connue, ce milieu contient : 10g de source de carbone (le glucose, le glycérol, le saccharose, l'amidon et la dextrine) ; 2g de NaCl ; 1g de K_2HPO_4 ; 0.5g de KH_2PO_4 ; 0,2g de $MgSO_4$, 7H2O ; 2g de $CaCO_3$; 2g de $(NH_4)2SO_4$.

- **MSS (Milieu semi synthétique)**

Sa composition exacte est mal connue que pour certains composants (d'un point de vue quantitatif, pour les produits ayant un intérêt, comme les facteurs de croissance), les autres composants étant présents de manière empirique. Ce milieu est composé de : 10g de source de carbone (le glucose, le glycérol, le saccharose, l'amidon et la dextrine) ; 2g de NaCl ; 1g de K_2HPO_4 ; 0.5g de KH_2PO_4 ; 0,2g de $MgSO_4$, 7H2O ; 2g de $CaCO_3$; 2g de $(NH_4)2SO_4$; 2g d'extrait de levure.

III.3.2.2.3.1. Préparation des sources de carbone

Cinq sources de carbone ont été choisies (glucose, glycérol, le saccharose, l'amidon et la dextrine), 1,5g pour chaque source de carbone est ajoutée à 10ml de l'eau distillée, afin

d'ajuster le volume du milieu à 150 ml pour garder la concentration des sources de carbone. Qui vont être autoclaves séparément des milieux de culture pour éviter la caramélisation des sources de carbone. Par la suite ces dernières sont additionnées après le refroidissement des milieux de culture.

III.3.2.2.3.2. Ajustement de PH des milieux de culture et la stérilisation

D'une façon générale, la production des antibiotiques est optimale à PH légèrement basique tandis que les PH très alcalin ou au contraire acides, ne favorisent pas la production. Pour cela le PH des milieux est ajusté à 7,2 avec une solution de NaOH (pour régler le PH, ajouter du NaOH si le milieu est acide et ajouter l'HCl si le milieu est alcalin).

La stérilisation est effectuée dans un autoclave à vapeur d'eau sous pression (1 bar), à haute température de 121°C pendant 20min.Cette étape est destinée à détruire tous les germes présents au départ dans le milieu.

III.3.2.2.4. Préparation des cultures

Les cultures sont réalisées dans des erlenmeyers de 500ml contenant chacun 100ml de milieu de culture liquide ISP2/MS/MSS. Les fioles d'erlenmeyer sont ensemencées par un inoculum des pré-cultures en phase exponentielle de croissance (âgé de 48 h) d'actinobactérie, le volume de l'inoculation est de 3 ml (3% du volume utile). Les cultures sont incubées dans un shaker aux mêmes conditions de température et d'agitation que les prés-cultures (30°C et 250 rpm) pendant 10 jours, cette durée correspond à la production maximale de substances actives produite par la souche. Cette préparation sert d'avoir une population bactérienne en forme, surement dans la phase exponentielle.

III.3.2.2.5. Prélèvement

La cinétique est une théorie expliquant un ensemble de phénomènes par le mouvement de la matière pour déterminer le milieu et le jour optimal de la production dans des conditions déterminées. Cette cinétique a été suivie pendant 10 jours à partir des prélèvements ponctuels, qui ont été effectués quotidiennement en prélevant 2ml de chaque culture avec une micropipette dans des tubes d'eppendorf (120 tubes eppendorf pour l'activité, 120 tubes eppendorf pour la biomasse).

Des prélèvements de 2 ml ont été réalisés à des intervalles de temps fixe (24h) dans des conditions aseptiques à partir des fioles en agitation, ces prélèvements ont été mis dans deux eppendorf de 2 ml stériles. Le premier est destiné à l'estimation des variations de PH et de la

biomasse, et le second sert à l'évaluation de l'activité antimicrobienne vis-à-vis des germes cibles.

III.3.2.2.6. Test d'activité antibactérienne

L'activité antimicrobienne est mesurée par la méthode de diffusion des puits. Cette méthode préconisée par **Aszalos (1986),** pour but de mesurer toute substance utilisée pour détruire les micro-organismes ou empêcher leur croissance, y compris, agents antibactériens et antifongiques.

Après centrifugation à 12000 *rpm* pendant 10 mn, une aliquote de 0,1 ml du surnageant du milieu de fermentation est introduite au fond d'un puit de 10 mm de diamètre (dont chaque puit pour un jour précis) creusé à l'aide d'un emporte-pièce en acier inoxydable stérile dans le milieu ISP2 semi solide (contenant 12 g d'agar par litre uniquement, pour permettre une meilleure diffusion des substances actives) préalablement ensemencé avec un germe cible. Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2h, puis incubées à 30°C pendant 24h. La lecture des résultats de l'activité antibactérienne est estimée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition (zone claire) autour des puits de la souche (figure 4).

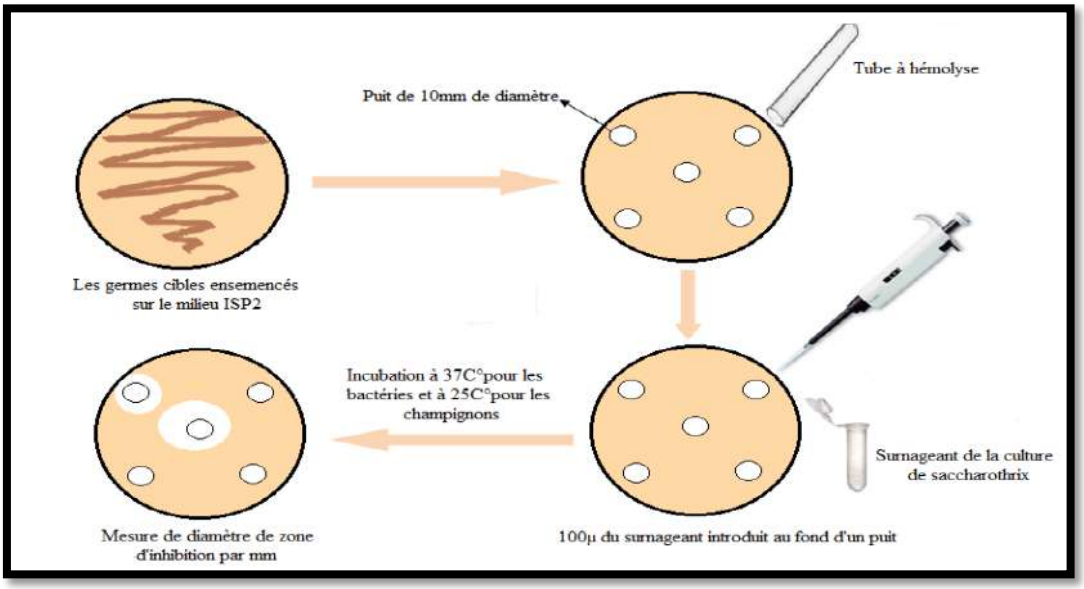

Figure 4 : Mise en évidence de l'activité de la souche AHO23 sur ISP2 par la méthode des puits.

III.3.2.2.7. Suivi du PH des cultures de la souche AHO23

Le PH et la croissance sont également mesurés durant toute la période de culture. Chaque jour, une aliquote de 2 ml de la culture homogénéisée est prélevée stérilement dans un tube eppendorf de 2 ml préalablement taré. Après centrifugation à 12000 *rpm* (Centrifuge 54 14 R) pendant 10 mn, le surnageant est récupéré séparément et utilisé immédiatement pour

enregistrer les variations du PH au cours du temps d'incubation par un PH mètre (HANNA instruments). Le suivi de l'évolution de PH permet de mesurer l'activité de l'antibiotique et aussi savoir si le milieu est contaminé ou pas.

III.3.2.2.8. Suivi de la croissance de la souche AHO23

Cette mesure est effectuée selon la méthode de **Pfefferle et *al.*, (2000).** Après avoir récupérer le surnageant, le culot mycélien obtenu de la centrifugation est lavé par l'HCl pour éliminer le $CaCO_3$, exception faite pour les tubes eppendorf de l'ISP2.

Une deuxième centrifugation se réalise pour passer au lavage avec l'eau distillée, ensuite une troisième centrifugation est opérée, les eppendorf contenant le culot servira pour la mesure de la croissance cellulaire en fonction du temps (par mesure du poids sec de la biomasse contenue dans un volume de culture connu), puis déposés dans un four à 105°C pendant 24 h afin d'éliminer les goulettes d'eau issues du rinçage. Le poids sec obtenu est rapporté en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture. Les pesées sont effectuées sur une balance analytique (KERN).

III.3.3. Recherche du meilleur solvant d'extraction antimicrobien de la souche AHO23

Pour sélectionner le meilleur solvant d'extraction de l'antibiotique. Trois solvants non miscibles à l'eau ont été choisis de polarité croissante.

III.3.3.1. Préparation des cultures

La production de métabolites actifs a été réalisée sur milieu ISP2 liquide, les souches sont inoculées dans des erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml du milieu de culture, ont été inoculées par 3 ml de pré-culture, et les cultures sont incubées à 30°C sous l'agitation de 250 rpm, jusqu'au jour optimal de la production déterminée lors de la cinétique.

III.3.3.2. Extraction des substances antimicrobiennes

Le principe de l'extraction par les solvants organiques se résume en une séparation du milieu de fermentation en deux phases ; une phase organique et une phase aqueuse et de faire passer les molécules bioactives dans la phase organique.

Selon la technique décrite par **Badji et *al.*, (2005)** et celle de **Zitouni et *al.*, (2005),** l'extraction des antibiotiques à partir du surnageant de culture exige le choix d'un solvant non miscible à l'eau. À cet effet trois solvants de polarité croissante ont été utilisés (Acétate d'éthyle, Butanol et Dichlorométhane).Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction qui permet d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé.

Les cultures sont refaites dans le milieu choisi et sont arrêtées au jour de production optimale (précédemment déterminé lors des cinétiques). Le surnageant est récupéré après une centrifugation afin d'éliminer la masse mycélienne et garder uniquement les substances actifs produites par la souche, puis mélangé dans une ampoule à décanter avec un mélange à volume égal de solvant(s)/surnageant de culture (V filtrat = V solvant) avec une douce agitation pendant quelques secondes et dégazage de temps à autre. Après agitation et décantation, la phase aqueuse a été éliminée et la phase organique (supérieure) est récupérée, puis filtrée par passage à travers un papier filtre (Whatman n°1) contenant du sulfate de sodium anhydre (entonnoir + papier filtre+ 2g de sulfate de sodium ou un peu plus) afin d'assurer l'élimination de toute trace d'eau résiduelle et tous les impuretés et les contaminants hydrophiles restants. L'extrait de la phase organique est concentré à sec à l'aide d'un rotavapor puis solubilisé dans un volume de méthanol, pour être testés par la méthode d'antibiogramme.

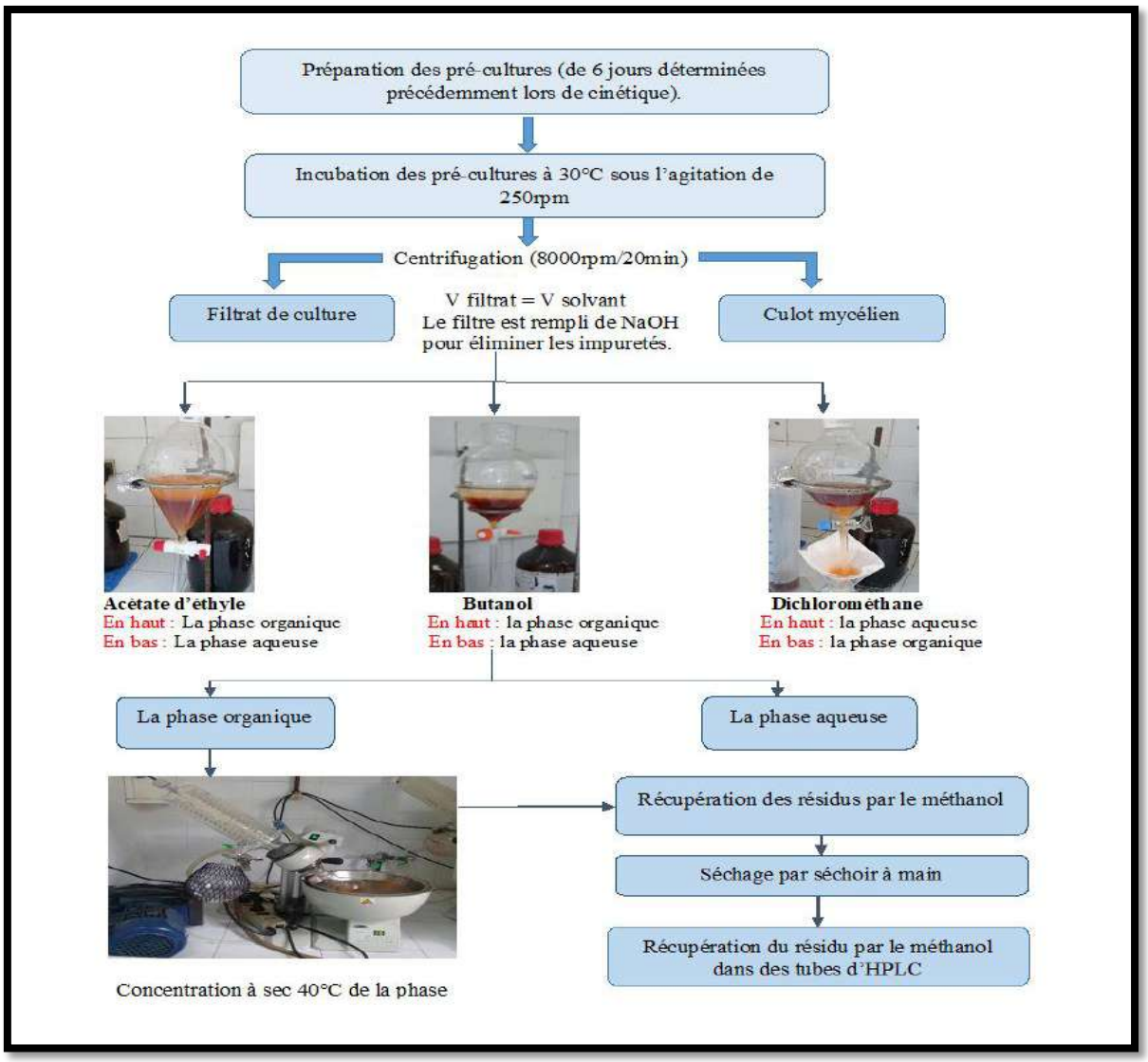

Figure 5 : Extraction des antibiotiques à partir des filtrats de cultures.

III.3.3.3.Antibiogramme

Les différents antibiotiques testés appartiennent à la souche AHO23, extraits à partir de différents solvants. L'efficacité de ces antibiotiques est testée vis-à-vis des germes cibles par la méthode d'antibiogramme.

Elle consiste a utilisé des disques en papier buvard de 6mm imprégnés d'une concentration fixe d'antibiotique (80µL), ou d'antifongique (100µL), dans des conditions d'asepsie par une micro-seringue, afin de tester la sensibilité des germes bactériens aux antibiotiques. Les disques sont séchés à froid par l'intermédiaire d'un séchoir, afin d'évaporer le solvant, puis sont stérilisés sous UV à 254nm pendant 45min, avant d'être placés à l'aide d'une pince stérile soigneusement à la surface du milieu gélosé ISP2 semi solide inoculé par une suspension d'une culture pure et identifiée d'un germe cible. Les disques ne sont pas déplacés après leur application.

Les boites sont maintenues à 4c° pendant 2h pour permettre une pré-diffusion de l'antibiotique et l'antifongique, avant d'être incubées à 30c° pendant 24h. Pendant cette période, ces substances actives se diffusent de façon uniforme. Un gradient de concentration s'établit entre la culture du germe cible et la diffusion du disque, qui s'exprime par une zone d'inhibition de la culture, qui a été mesurée avec précision par une règle. La détermination des diamètres des zones d'inhibition permet une estimation de la concentration minimale inhibitrice des germes cible aux substances testés.

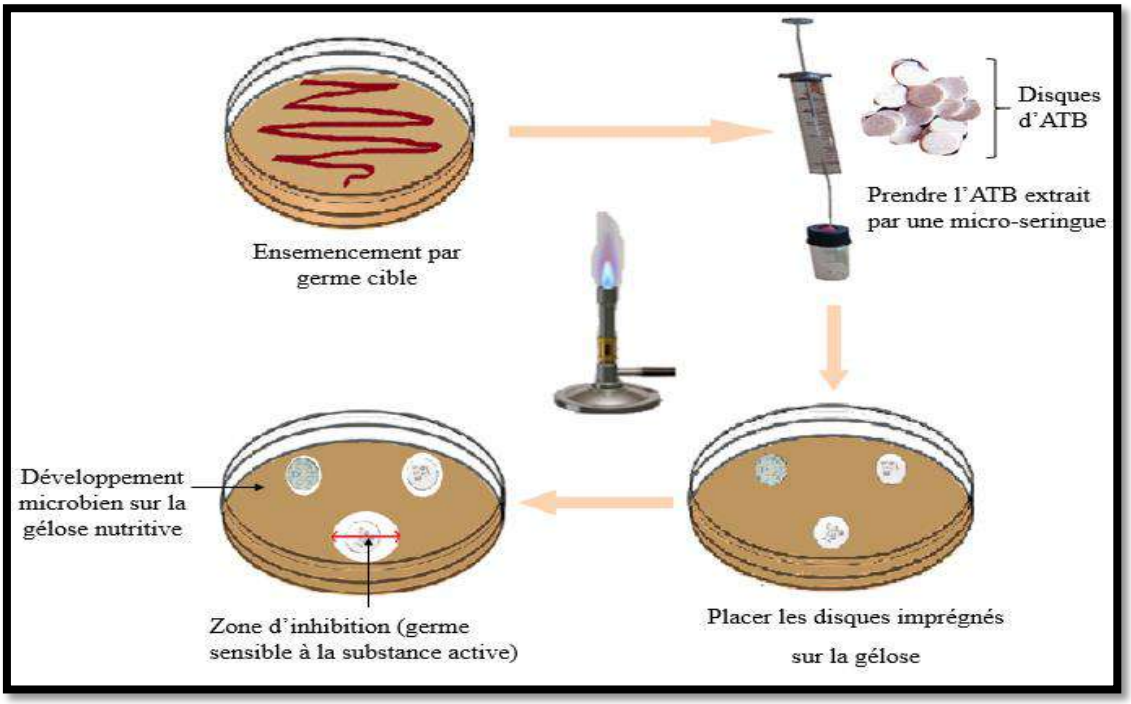

Figure 6 : La méthode de l'antibiogramme.

III.3.3.4. Analyse de l'extrait de la souche AHO23 par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) est une méthode physique d'analyse basée sur la séparation et la purification d'un ou de plusieurs composés d'un mélange en vue de leur identification et de leur quantification.

L'appareil d'HPLC utilisé est de marque Agilent®1260, équipé par des éléments qui sont résumés dans l'annexe 1.

La phase mobile liquide (éluant) constituée par un mélange filtré et dégazé de méthanol et d'eau bidistillée, elle croitre selon un gradient continu de 20 à 100% de méthanol dans l'eau pendant 30 min, Le débit de l'éluant est de 1 ml/min et la détection se fait à 220 nm à cette longueur d'onde tous les composés (colorés et non colorés) sont détectés.

Avant l'injection des échantillons, la colonne (phase stationnaire) est conditionnée et équilibrée avec 20% de méthanol dans l'eau pendant 30min. Les extraits organiques obtenus après l'extraction initiale, qui ont été effectuées à partir des cultures poussées sur le meilleur milieu et la période préférable de la production d'antibiotique. Ces extraits sont séchés, solubilisés dans 1 ml de méthanol, et ultrafiltrés à l'aide d'un filtre de 0,2 µm de porosité, puis ils sont introduits dans l'appareil HPLC à raison de 100 µL par injection.

Les fractions obtenues (matérialisées dans les chromatogrammes par des pics) sont récupérées séparément par l'évaporation du solvant sous vide à 40°C puis testées par antibiographie contre les bactéries de type : *Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus 639, Listeria monocytogenes, Mycobacterium leprae, Salmonella typhi, Escherichia coli(E.coli25922) (E.coli87), Pseudomonas aeruginosa, Agrobacterium, Aspergillus carbonarius*. Contre les champignons de type : *Aspergillus ochraceus, Aspergillus fumigatus, Fusarium culmurum, Fusarium poae, Umbelopsis ramanniana, Penicillium expansum, Penicillium glabrum, Candida albicans*.

Afin de localiser les fractions actives, le tableau 5 résume les conditions d'élution des antibiotiques par HPLC.

Tableau 5 : Conditions d'élution des antibiotiques par HPLC.

	Temps (min)	Débit (ml/min)	Eau (solvant A %)	Méthanol (solvant B %)
« Pré-run » (équilibrage de la colonne)	10	1	80	20
« Run » (gradient linéaire)	0 55	1 1	80 0	20 100
« Post-run » (lavage de la colonne)	55 65	1 1	0 0	100 100

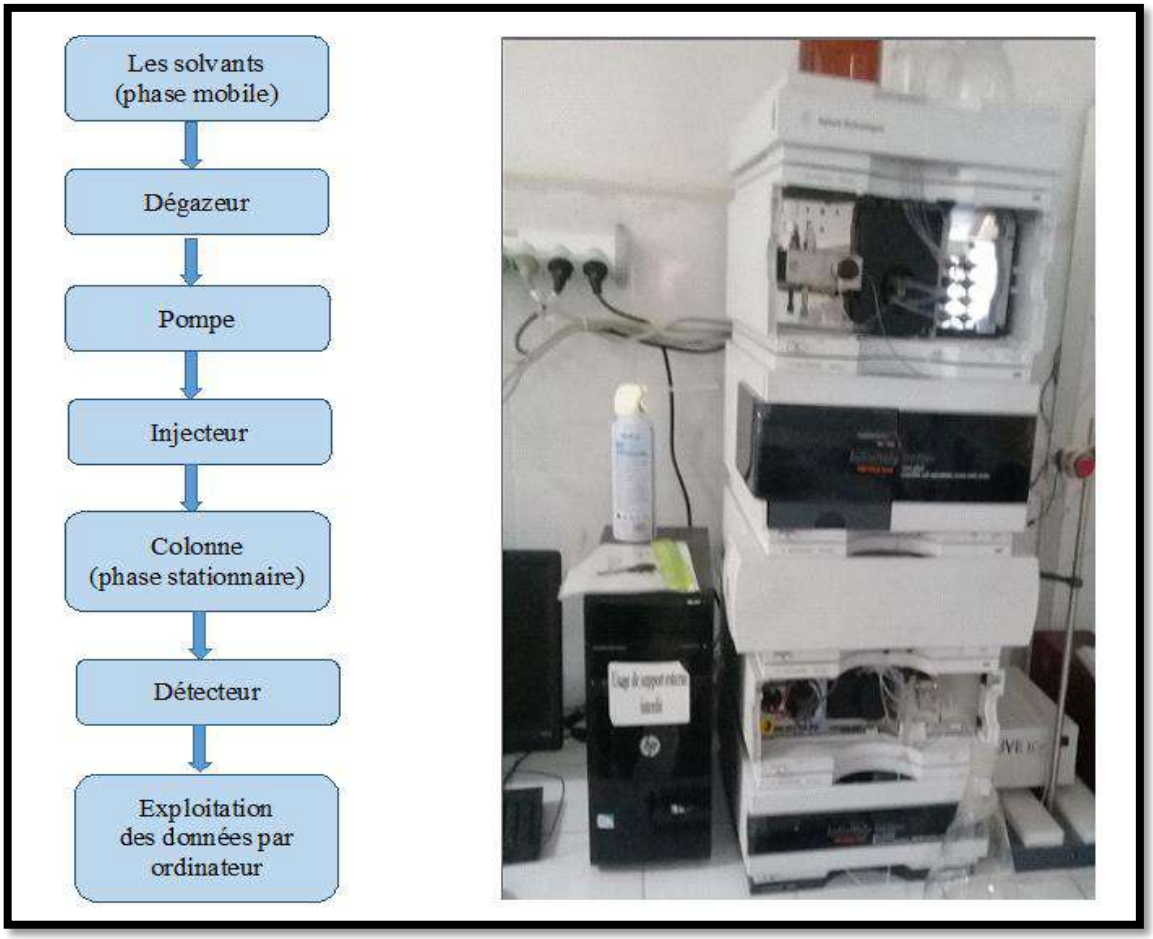

Figure 7 : Schéma de l'installation de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC Agilent®1260).

Chapitre IV
Résultats et discussion

IV.1 ETUDE TAXONOMIQUE DE LA SOUCHE AHO23

IV.1.1. Caractéristiques phénotypiques et phylogénétiques d'isolat

IV.1.1.1. Résultats

IV.1.1.1.1 Caractéristiques macro et micromorphologiques

Lors de cette étude, nous avons remarqué que, d'une manière générale, la croissance de la souche AHO23 est bonne sur les milieux ISP2 et moyenne sur ISP4. Quant à la production du mycélium aérien (MA), elle est favorisée par au moins un des milieux de culture utilisés (le meilleur étant ISP2). L'observation au microscope optique, au grossissement, 10 x 40 a montré que le MA est ramifié et se fragmente de manière anarchique, souvent en zig-zag, donnant naissance à des chaînes de spores coccoïdes ou en bâtonnets, plus ou moins individualisées et non mobiles. Les résultats consignés dans le tableau 6 et illustrés dans la figure 8.

D'après les caractéristiques culturales et micromorphologiques, de la souche AHO23 est été classée dans le genre *Saccharothrix*. Leur MA se fragmente anarchiquement en chaînes de spores moins individualisées et qui ne laissent pas d'espaces entre elles.

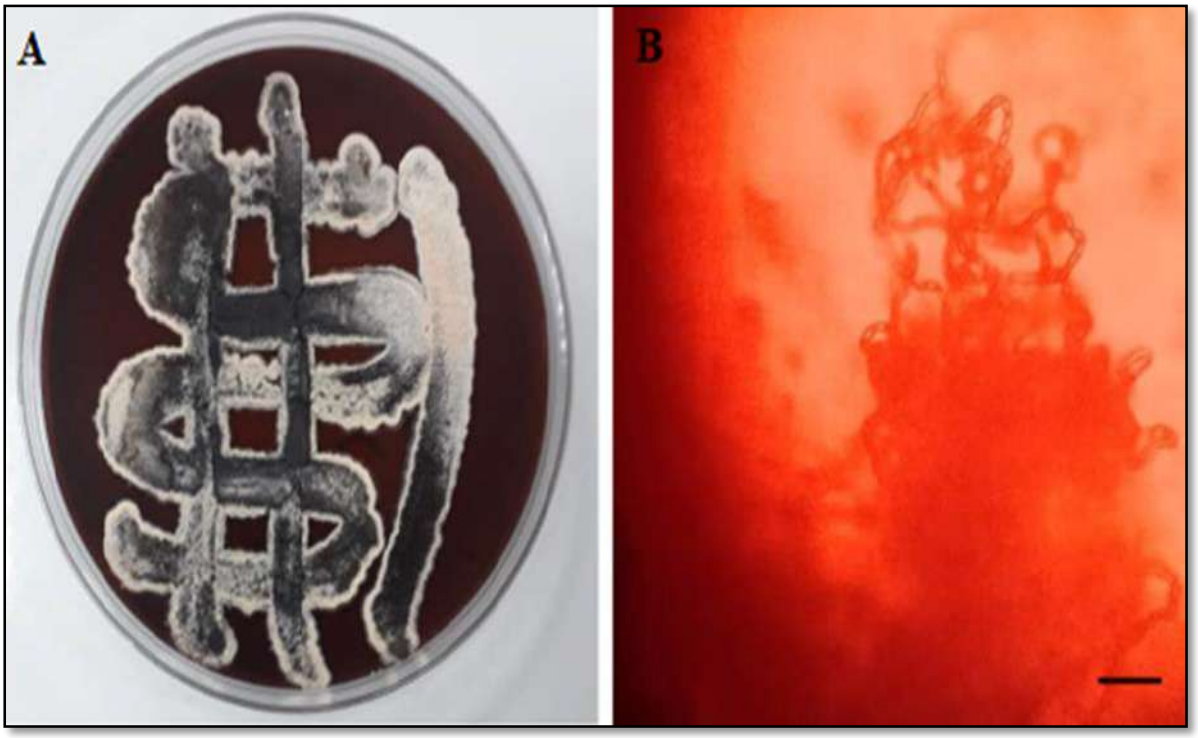

Figure 8. Macromorphologiques(A) et Micromorphologie(B) de la souche AHO23. Les chaine de spores de la souche AHO23 poussant sur milieu ISP2 et observés au microscope optique (grossissement 10 x 40).

Milieu de culture	Croissance	Les Caractéristiques culturales		Pigment soluble
		mycelium Aérien	mycelium de Substrate	
ISP2	+++	+ beige à beige moyen	Brun rougeâtre très foncé	++++ rouge foncé
ISP4	++	++ rose à rose orangé	++ orange moyen	+++ orange moyen
CHV	++	+ rose blanchâtre	rose blanchâtre à rose très clair	± rose clair

Tableau 6 : Caractéristiques culturales de la souche AHO23.

IV.1.1.1.2. Caractéristiques physiologiques

L'étude physiologique concerne l'isolat de la souche AHO23 dans le but de la différencier de celle de l'espèce *Saccharothrix xinjiangensis* appartenant au même groupe morphologique, les résultats sont résumés dans le tableau 7**.**

Tableau 7 : Comparaison des caractéristiques physiologiques de la souche AHO23 Avec l'espèce de *Saccharothrix xinjiangensis*.

Tests	AHO23	*Saccharothrix xinjiangensis* NBRC 101911^{T} (AB381939)
Utilisation de source de carbone :		
L-arabinose	+	+
Lactose	+	+
Raffinose	-	+
L-rhamnose	+	+
D-sucrose	+	+
D-xylose	+	+
Methyl α-D-glucose	-	+
D- sorbitol	-	-
Melibiose	-	+
Hydrolyse de :		
Gelatin	++	Nd
Citrate	Nd	Nd
Lactate	Nd	Nd
Starch	+	+
Tyrosine	+	-
Nitrate reduction	+	-
Croissance en presence de:		
5% NaCl (w/v)	-	-

Note : + : test positif ; – : test négatif ; Nd : non déterminé.

Les résultats des tests physiologiques au niveau de ce tableau montrent :

- Les ressemblances entre la souche AHO23 et *Saccharothrix xinjiangensis* dans l'utilisation de L'arabinose, Lactose, L-rhamnose, D-sucrose, D-xylose, et dans l'hydrolysation de Starch. La souche AHO23 et *Saccharothrix xinjiangensis* poussent en présence de 5% de NaCl (w/v).
- Les différences sont au niveau de la dégradation de Raffinose, Methyl α-D-glucose, Melibiose et l'hydrolysation de Tyrosine et la réduction de nitrate.

IV.1.1.1.3. Caractéristiques phylogénétiques

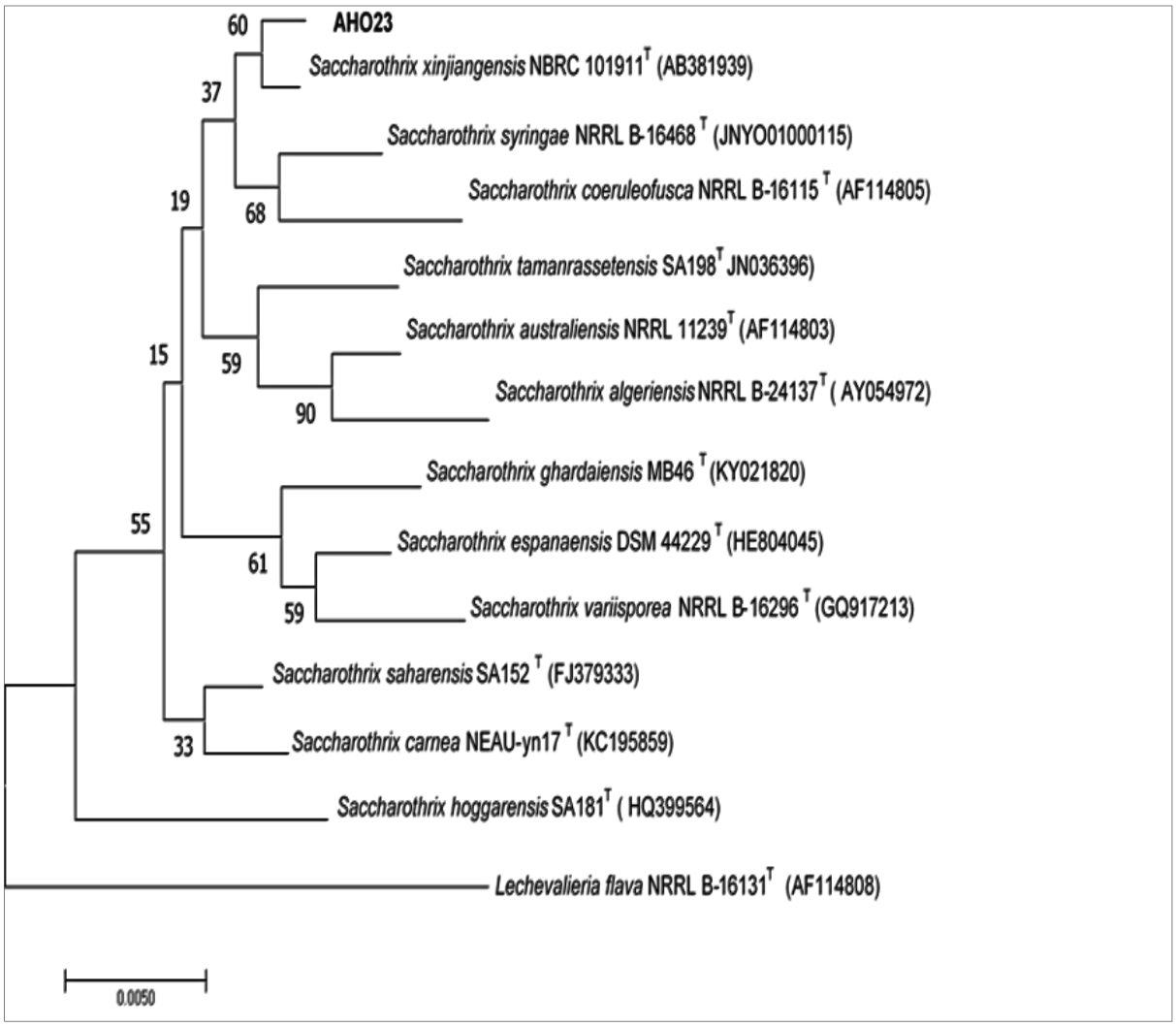

Figure 9 :.Arbre phylogénétique (neighbor-joigning) basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche AHO23.

Note : Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les pourcentages du « bootstrap », et la barre indique 0,005 substitutions par position de nucléotide. L'espèce *Lechevalieria flava* est ajoutée comme "outgroup".

La souche AHO23 est révélée appartenir au genre *Saccharothrix*. Ce genre, mis en évidence pour la première fois par **Labeda et *al*., (1984)**, a été également isolé à partir des sols sahariens où plusieurs nouvelles espèces ont pu être décrites suite aux travaux de laboratoire LBSM. C'est le cas de *Saccharothrix algeriensis* **(Zitouni et *al*., 2004a)**, *Saccharothrix. Saharensis* et *Saccharothrix*. hoggarensis **(Boubetra et *al*., 2013)**, ainsi que *Saccharothrix. tamanrassetensis* **(Boubetra et *al*., 2015)**. De même, les résultats de l'étude physiologique, renforcés par ceux de l'étude moléculaire, ont montré que cette souche se rapproche de différentes espèces appartenant à ce genre.

L'analyse de la fraction du gène codant pour l'ARNr 16S de la souche AHO23, a permis de confirmer les résultats des études phonétiques quant à leur appartenance au genre *Saccharothrix*, avec des taux de similarités compris entre 97 et 98,60 % selon les espèces. L'espèce la moins différente étant *Saccharothrix xinjiangensis* **(Labeda et Lyons, 1989)**, avec un pourcentage de similarité de 99,64 %. L'arbre phylogénétique obtenu (Figure 9) a montré que cette souche est proche entre elle et forme un cluster avec cette espèce. Des pourcentages de similarité inferieur s à 98,65 % ont été également enregistrés avec *Saccharothrix hoggarensis*.

IV.1.1.2. Discussion

L'exploitation du genre *Saccharothrix* effectuée dans les sols sahariens de la région de Tamanrasset. Cette région occupe une place de choix parmi les sols sahariens d'Algérie qui représentent des écosystèmes extrêmes et particuliers, révélés être et riches en genre *Saccharothrix*. Les travaux effectués par **Sabaou et *al*. (1992 et 1998)**, **Boudjella (1994)**, **Zitouni (1995)**, **Zitouni et *al*. (2004)**, **Badji et *al*. (2005, 2007)**, **Meklat (2012)**, **Aouiche (2013)** et **Saker (2015)** ont montré la richesse de ces sols en actinobactéries, y compris des genres rares ou peu fréquents.

Dans ce travail, une étude taxonomique a été élaborée pour identifier notre souche, avant d'entamer le protocole de production d'antibiotique. Cette étude repose sur les caractéristiques morphologiques (macro et micromorphologiques), physiologiques (par utilisation de composés organiques et tester la sensibilité à certains agents physiques et chimiques), et moléculaires (séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et hybridation ADN/ADN) **(Goodfellow et *al*., 2012)**.

En premier lieu, nous avons examiné la morphologie de la souche AHO23, les résultats de cette étude sont illustrés dans la figure 8 et dans le tableau 6. Cela nous permet de classer provisoirement la souche AHO23 au genre *Saccharothrix*.

La souche AHO23 possède un mycélium aérien qui se fragmente de manière anarchique en longues chaînes de spores immobiles (souvent en zig-zag) et un mycélium du substrat fragmenté.

D'après **Labeda et *al* en 1984**, la caractéristique macro et micromorphologiques de la souche AHO23 ressemblent absolument à celles du genre *Saccharothrix*, en plus de certains détails comme l'absence d'espaces entre les spores du MA et la fragmentation parfois exagérée du mycélium du substrat montrent l'appartenance de ces souches au genre *Saccharothrix*.

En second lieu, nous avons étudié les caractéristiques physiologiques et moléculaires de l'isolat d'actinobactérie afin de confirmer les genres et de déterminer les espèces le plus proches.

La variabilité des résultats des tests physiologiques entre la souche AHO23 et *Saccharothrix xinjiangensis NBRC101911T (AB381939)* au sein d'un même groupe morphologique sont présentés dans le tableau 7, nous laissent supposer que cette souche pourrait appartenir à une nouvelle espèce du genre *Saccharothrix*. Toutefois, leur originalité reste à confirmer par des hybridations ADN-ADN pour assurer leur position taxonomique. Cependant, l'arbre phylogénétique illustré par la figure 9 montre que cette souche constitue une lignée qui s'est révélée être bien distincte de toutes les espèces existantes de *Saccharothrix*.

Tous ces résultats, confirment fortement que la souche AHO23 appartient à une nouvelle espèce du genre *Saccharothrix.*

IV.2.PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES PAR LA SOUCHE AHO23

IV.2.1. Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche AHO23 sur milieu solide

IV.2.1.1 Résultats

La souche AHO23 de *Saccharothrix sp.* a été testée pour son pouvoir antagoniste par la méthode des cylindres d'agar sur milieu solide ISP2 contre divers germes cibles dont des bactéries à Gram positif, à Gram négatif, des champignons filamenteux et une levure. Les distances d'inhibition de la croissance des germes-cibles sont consignées dans le tableau 8.

Tableau 8 : Activité antagoniste de l'isolat AHO23 de *Saccharothrix* sp. contre les germes-cibles par la méthode des cylindres d'agar.

Les microorganismes cibles	zone d'inhibition (mm)
Staphylococcus aureus (MRSA 639c)	29
Staphylococcus aureus (S)	33
Listeria monocytogenes (ATCC 13932)	30
Bacillus subtilis (ATCC 663)	34
Escherichia coli (ATCC 8739)	34
Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)	15
Acinetobacter baumannii (S54)	26
Salmonella typhi (ST)	0
Agrobacterium(Agro)	32
Aspergillus carbonarius (AC)	24
Aspergillus westerdijkiae (ATCC 3174)	26
Aspergillus fumigatus (AF)	21
Aspergillus ochraceus (A0)	23
Umbelopsis ramanniana (NRRL 1829)	22
Penicillium exapansum (Pe)	25
Penicillium glabrum (Pg)	30
Fusarium poae (Fp)	24
Fusarium culmorum (Fc)	36
Candida albicans (M3)	20

Les résultats obtenus montrent une activité variable de la souche AHO23 de *Saccharothrix sp.* vis-à-vis des germes cibles testés. Cette souche a présenté un effet antimicrobien remarquable contre tous les germes-cibles, avec une zone d'inhibition plus importante contre le champignon filamenteux *Fusarium culmorum* (36 mm), ainsi que les bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis* (34mm), *Staphylococcus aureus* (33mm) et *Listeria monocytogenes* (30mm).

Cependant la souche a montré une activité moyenne entre (26mm et 20mm) contre les autres champignons filamenteux et la levure. Ainsi contre les bactéries à Gram négatif telles

qu'*E. coli* avec une zone d'inhibition de 34 mm, *Agrobacterium* (32mm) et *Acinetobacter baumannii* avec 26mm, *Pseudomonas aeruginosa* (15mm) sauf *Salmonella typhi* (0mm) qu'elle présente plus de résistance par rapport aux autres.

IV.2.1.2. Discussion

La souche AHO23 de *Saccharothrix sp.* cultivée dans le milieu ISP2 est active contres tous les microorganismes testés. Le choix de l'ISP2 comme milieu de culture est basé sur les travaux de **Badji (2006), Boudjella (2007), Aouiche (2013), Boubetra (2013), Toumatia (2015) et Driche (2016)** qui ont tous obtenu de très bons résultats avec ce milieu de culture par rapport à d'autres milieux. Le milieu ISP2 est riche en éléments nutritifs (milieu complexe), fournit des facteurs de croissance et d'autres précurseurs qui favorisent la production des antibiotiques par les souches d'actinobactéries.

Le pouvoir antimicrobien de la souche d'actinobactérie mycélienne a été évalué par la méthode des cylindres d'agar contre 20 microorganismes-cibles. Cette méthode convient mieux à mesurer la sensibilité des microorganismes cibles à l'antibiotique testé. Une bonne activité antimicrobienne a été obtenue par la souche AHO23. En effet d'autres travaux précédents ont montré des propriétés antagonistes intéressantes des espèces appartenant au genre *Saccharothrix* **(Lamari et *al.*, 2002 ; Zitouni et al. 2004a ; Merrouche et *al.*, 2011; Aouiche et *al.*, 2012; Boubetra, 2013 et Bouznada, 2018)**. Le genre *Saccharothrix* est connu comme regroupant des espèces et des souches productrices de plusieurs antibiotiques à spectre d'action assez large.

Ces substances actives appartiennent à des familles et à des groupes différents, tels que les aminoglycosides et les benzoquinones **(Takahashi et *al.*, 1986)**, les glycopeptides **(Takeuchi et *al.*, 1992)**, les nucléosides carboxyliques **(Bush et *al.*, 1993)**, les heptadécaglycosides **(Singh et *al.*, 2000)**, les dithiolopyrrolones (**Lamari et *al.*, 2002; Merrouche et *al.*, 2010; Merrouche et *al.*, 2011)**,les anthracyclines **(Zitouni et *al.*, 2004)**, les macrolides **(Powell et Roush, 2001; Zitouni, 2005; Murakami et *al.*, 2009)**, les angucyclines **(Kalinovskaya et *al.*, 2010)**, les aromatiques benzéniques **(Aouiche et *al.*, 2012)** , les cyanogrisides **(Lahoum, 2017)** et les phénicolés **(Aouiche et al., 2012)**.

Une bonne activité antimicrobienne a été observée contre toutes les bactéries Gram positif et les champignons et à degré moindre chez la levure, tandis que l'activité était moyenne vis-à-vis les bactéries à Gram négatif par rapport à leurs homologues les Gram positif.

Les résultats obtenus par plusieurs auteurs ont mentionné que la plupart des antibiotiques sécrétés par les souches de *Saccharothrix* ciblent surtout les bactéries à Gram

positif et rarement dirigée contre les bactéries à Gram négatif. Cependant, le cas de *Saccharothrix spp.*MB29 de **Bouznada (2018)** n'a enregistré aucune activité contre *E. coli*, par contre notre souche AHO23 a noté des résultats contre trois bactéries à gram négatif qui sont *E. coli*, *Agrobacterium* et *Acinetobacter.* En revanche les bactéries à Gram négatif se sont révélées plus au moins résistantes comme *Salmonella typhi* dans notre cas **(Takeuchi et *al.*, 1992; Kinoshita et *al.*, 1999; Wang et *al.*, 2000; Lamari et *al.*, 2002a; Zitouni, 2005)**. Les études ont déclaré que l'intensité de cette résistance est due en premier lieu, à l'enveloppe des bactéries à Gram négatif qui peut moduler la diffusion de l'antibiotique de son entrée par les porines situés sur la membrane externe, ainsi réguler son expulsion par le transport actif assuré par les pompes d'efflux qui se traversent les deux membranes de l'enveloppe **(Gupta et *al.*, 2011)**.

En second lieu, à l'occurrence facile de ces microorganismes aux plasmides portants des gènes de résistance mobiles **(Carattoli et *al.*, 2006 ; Carattoli, 2009)**.

IV.2.2. Cinétique de croissance, de PH et de production des antibiotiques par la souche AHO23 en milieu liquide

IV.2.2.1. Résultats

Une cinétique de croissance, de PH et de production des molécules bioactives par la souche AHO23 a été suivie quotidiennement pendant 10 jours d'incubation sur deux milieux de culture liquides de nature différente (le milieu ISP2, le milieu MS ajoutée de dextrine) dans le but de déterminer le milieu le plus favorable à la production d'antibiotique et le temps d'incubation nécessaire à cette production. Cette étude a été effectuée par la méthode de diffusion des puits contre *Escherichia coli* **(Ec)**, *Listeria monocytogenes* **(Lm),** *Staphylococcus aureus 639* ***(*Sa.S639*)***, *Aspergillus carbonarius* ***(*AC)**, *Aspergillus ochraceus* **(AO)**, *Fusarium culmurum* **(FC)** et *Umbelopsis ramanniana* **(UR)**.

IV.2.2.1.1 Milieu ISP2

Les résultats illustrés par la figure 12 montrent que la croissance débute par une phase d'accélération au 1er jour, suivi d'une phase exponentielle entre le 1er et 3ème jour, cette phase est accompagnée d'une augmentation du poids sec à cause de la ramification du mycélium. Et elle la suit une phase stationnaire (J3 à J5), ensuite une courte phase de déclin entre le 5 ^{ème} et le 7ème jour .Au-delà du 7ème jour, il est noté l'apparition d'une deuxième phase exponentielle du 7ème jour au 10ème jour avec une courte phase stationnaire entre le 9ème et 10ème jour.

Sur le milieu ISP2, le PH s'acidifie légèrement de (PH=7.2) à (PH=6,7) entre le 1er et le 2éme jours, puis il augmente de nouveau d'une manière progressive jusqu'au 10ème jour (PH=8.4).

La production de molécules antibactériennes contre *E. coli*, et *L. monocytogenes* commence à apparaitre dès le premier jour de la cinétique. Par la suite, cette activité augmente progressivement et atteint son maximum le 6ème jour, ensuite une légère diminution a été remarquée, puis elle a progressé de nouveau pour la deuxième fois au 9ème. L'activité contre Sa.S639, n'est remarquée qu'à partir du 4ème jour, elle augmente graduellement pour atteindre un premier pic au 6ème jour et un deuxième pic au 9ème jour.

L'activité antifongique débute le 4ème jour de la cinétique. Les meilleures activités ont été notées par *F.culmurum* avec 2 maximas (le 6éme et le 7éme jour) ainsi que *A. carbonarius* avec une maximum activité pendant le (5éme et le 9éme jour). Alors que des bonnes activités ont été enregistrées par *U.ramanniana* et *A. ochraceus* pendant les deux maximas (6éme et 10éme jour). Chaque maximum est suivi par une diminution graduelle de l'activité.

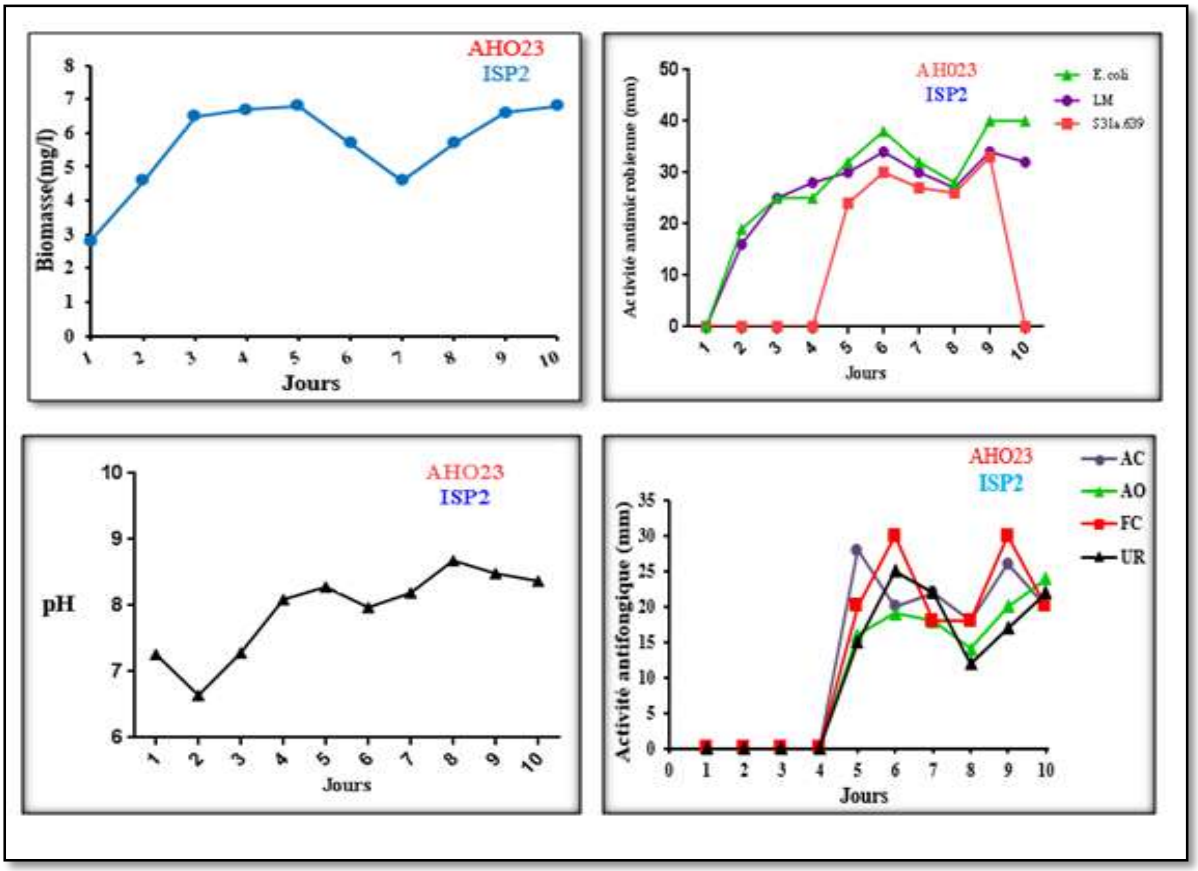

Figure 10 : Cinétique de croissance, de PH et de production des antibiotiques par la souche AHO23 sur le milieu ISP2.

IV.2.2.1.2 Milieu MS additionnée de dextrine

La croissance de la souche AHO23 dans le milieu synthétique additionnée de dextrine, débute par une phase d'accélération et une phase exponentielle entre le 1er et le 3ème jour, suivi d'une phase stationnaire (J3 à J5), puis une phase de déclin qui commence à partir de 5ème jour jusqu'à la fin de la cinétique.

Au cours de cette croissance, L'évolution du PH connait d'abord une acidification du milieu (PH=5,7) entre le 1er et le 3ème jour, puis une basification progressive est remarquée jusqu'au dernier jour de culture (PH=8,2).

Dans ce milieu de production, les activités antibactériennes vis-à-vis *L.monocytogenes* et *E. coli* est détectée dès le 1er jour de la cinétique par contre *Sa.S639* commence le 2ème jour, cette activité augmente graduellement pour atteindre une valeur maximale lors du 5ème jour.

Simultanément les activités antifongiques apparaissent le 4ème jour de la cinétique, cette activité est traduit par deux maxima le 5éme et 9éme jour (la phase stationnaire) pour *A. carbonarius* et *U.ramanniana*, et par trois maxima le 5ème, 8ème et 10ème jour (la phase stationnaire et la phase exponentielle) pour *F.culmurum* et *A. ochraceus*. Chaque maximum est suivi par une diminution graduelle de l'activité.

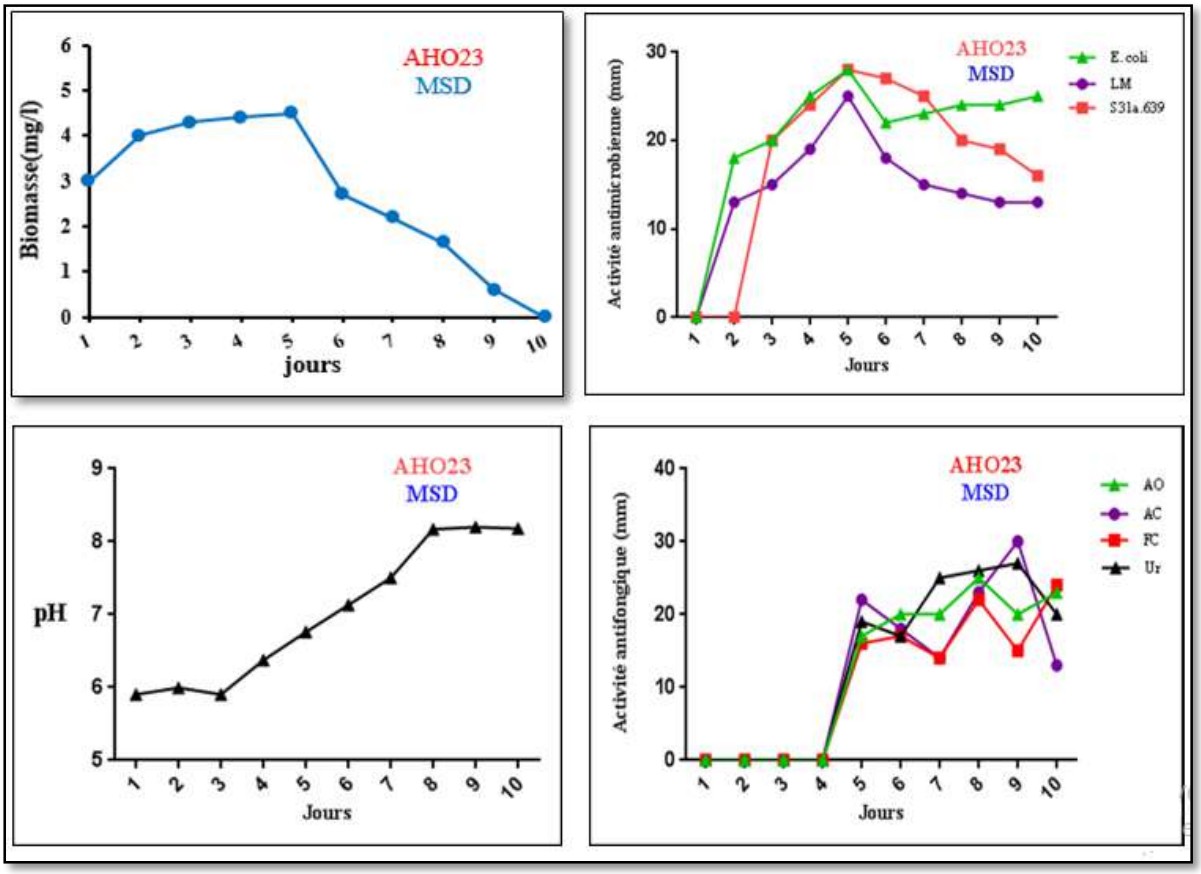

Figure 11 : Cinétique de croissance, de PH et de production des antibiotiques par la souche AHO23 en milieu MSD.

IV.2.2.2. Discussion

Les résultats obtenus dans la figure 10 montrent que la courbe de croissance du milieu ISP2 est caractérisée par la présence de deux phases exponentielles (phénomène de diauxie) séparée par une phase stationnaire. Ce phénomène s'observe lorsque le milieu contient deux sources de carbones, telles que le glucose et le lactose, le glucose et le galactose ou le glucose et le xylose **(Prescott et *al*., 2013)**, mais peut également se manifester en présence d'une seule source de carbone et une d'azote, comme le glucose dans notre cas.

Pendant la première phase exponentielle, les acides aminés de l'extrait de levure sont utilisés comme source de carbone et d'azote avec une faible consommation du glucose comme source d'énergie et durant la deuxième phase le glucose est utilisé comme source de carbone et d'énergie.

Cependant le PH du milieu ISP2 subit une acidification après le 1er jour, puis le PH s'augmente progressivement, et pour le milieu MSD est subit une acidification dès le 1er jour suivie par une alcalinisation jusqu'au dernier jour de la cinétique.

La diminution du PH dans les deux milieux est à cause de la dégradation des glucides **(Strub, 2008 ; Boubetra, 2013)**, alors que l'alcalinisation des milieux est expliquée par l'utilisation des acides aminés présents dans l'extrait de levure, qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium ; l'accumulation de ce dernier provoque l'augmentation du PH du milieu. La deuxième augmentation du PH dans le milieu ISP2 indique l'existence de deux phases exponentielles (phénomène de diauxie).

Nos résultats, montrent que la souche AHO23 a fourni une meilleure production des antibiotiques et une forte activité antimicrobienne dans le milieu ISP2 (riche en extrait de malt et contenant l'extrait de levure comme sources d'azote) mieux que le milieu MS-dextrine (contenant le sulfate d'ammonium comme seule source d'azote), qui a donné par son rôle des bonnes résultats en comparant par les autres milieux de cultures cités dans la partie matériels et méthodes.

Presque les mêmes résultats ont été approuvés par **(Badji, 2006 et Boudjella, 2007)** qui ont testé presque la plupart des milieux à cet effet, et ont trouvé que l'ISP2 a été le meilleur choix pour la production d'antibiotiques.

La production moindre des antimicrobiens dans le milieu MS par rapport au celle du milieu ISP2 pourrait être expliquée par le manque de l'extrait de levure et de malt qu'ils jouent un rôle déterminant dans la synthèse des antimicrobiens. L'extrait de levure, de part de sa composition, constitue une source d'azote riche et diversifiée très utilisée pour la production des antibiotiques **(Isshiki et al., 1989; Takeuchi et al., 1992; Kinoshita et al., 1999; Vertesy**

et al., 2001; Lamari et al., 2002 ; Pandey et al., 2005 ; Gao et al.,2009). Il pourrait aussi que la présence d'une grande quantité de dextrine dans le milieu synthétique (une concentration de 10g/l) exerce un effet négatif à la biosynthèse des molécules bioactives. Cet effet dépend de la dose puisque plusieurs auteurs ont constaté que les fortes concentrations de glucose ou d'autres sources carbonées rapidement catabolisables sont généralement défavorables à la production **(Martin et Demain, 1980 ; Demain et *al.*, 1983)**.

Dans notre cas, il semblerait que la quantité de dextrine n'exerce pas forcément un effet répressif sur la production de molécules antimicrobiennes par la souche AHO23, mais il faut noter que la production des antibiotiques en milieu ISP2 contenant 4g de glucose est meilleure que le milieu MS qui contient 10 g de source de carbone (dextrine).

Nous avons noté aussi que la production des molécules bioactives par la souche AHO23 a eu lieu au cours de la phase stationnaire et la phase de déclin (entre le 5ème et le 6ème jour). C'est un temps moyen puisque le maximum de production des antibiotiques en milieu liquide chez les actinobactéries, varie souvent de 3 à 14 jours. Généralement les microorganismes produisent les métabolites secondaires durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries, cette production peut avoir lieu parfois au tout début de la phase exponentielle ou encore durant la phase de déclin **(Zitouni, 2005 ; Badji, 2006)**, ce qui correspond à notre cas ou l'excrétion des antibiotiques se manifeste après la lyse des cellules.

De ce fait, on peut conclure que le premier choix à la production des métabolites secondaire par la souche *Saccharothrix sp.*AHO23 c'est milieu ISP2, puis s'installe le milieu synthétique ajoutée de dextrine en deuxième.

IV.3. Etude des molécules bioactives produites par *Saccharothrix sp.* AHO23

IV.3.1. Résultats

IV.3.1.1. Extraction et mise en évidence des antibiotiques par antibiographie

Les molécules bioactives secrétées par *Saccharothrix sp.* AHO23 sur milieu ISP2 liquide (le milieu le plus favorable pour la production des antibiotiques) sont extraits le 6ème jour de culture (jour optimale de production). Le filtrat de culture est récupéré par centrifugation et les antibiotiques sécrétés sont testés dans une ampoule à décanter par quatre solvants organiques de polarités différentes (dichlorométhane, acétate d'éthyle, butanol et hexane). Les extraits organiques sont concentrés à sec, puis récupérés dans 1 ml de méthanol pour tester leur activité par la méthode des disques de papier (antibiographie) vis-à-vis *Escherichia coli* **(E.coli)**, *Listeria monocytogenes* **(Lm)**, *Staphylococcus aureus 639* ***(*Sa.S639*)***, *Aspergillus*

carbonarius(**AC**), *Aspergillus ochraceus*(**AO**), *Fusarium culmurum*(**FC**) et *Umbelopsis ramanniana*(**UR**), afin de sélectionner le meilleur solvant d'extraction. Les résultats de l'extraction des antibiotiques à activité antimicrobienne par les quatre solvants sont consignés dans le tableau 9 et sont illustrés dans la figure 12.

Tableau 9 : Zones d'inhibition (mm) de la phase organique de la souche AHO23 issue de l'extraction par l'utilisation des 04 solvants organiques.

ISP2	BACTERIES				CHAMPIGNONS			
	LM		E. coli	Sa639	AO	AC	UR	FC
Dichlorométhane	50 mm	54 mm	46 mm	35 mm	15 mm	15 mm	32 mm	20 mm
Acétate d'éthyle	54 mm	56 mm	46 mm	42 mm	22 mm	18 mm	27 mm	20 mm
Butanol	60 mm	62 mm	45 mm	47 mm	25 mm	20 mm	45 mm	25 mm
Hexane	0	0	0	0	0	0	0	0

Selon les résultats de tableau 9 l'activité antibactérienne et antifongique est détectée dans les phases organiques des extraits au dichlorométhane, à l'acétate d'éthyle et au butanol, mais pour l'hexane aucune activité n'est détectée dans ces extraits de la souche AHO23.

Le dichlorométhane a été retenu de nos expérimentations comme le meilleur solvant d'extraction des composés bioactifs pour le milieu ISP2 même si son pouvoir d'extraction est légèrement moindre que celui de butanol et d'acétate d'éthyle.

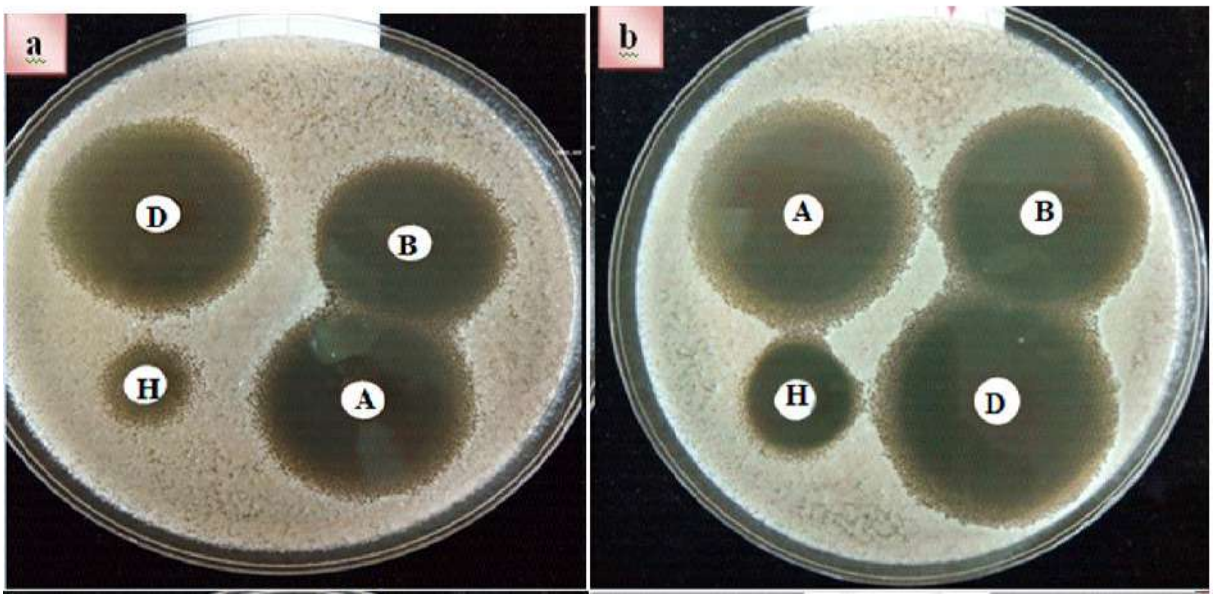

Figure 12 : Activité antibactérienne de l'extrait organique de la souche AHO23.
a: *L. monocytogenes* sur milieu ISP2, **b**: *E. coli* sur milieu ISP2

IV.3.1.2. Purification des molécules bioactives par HPLC

L'analyse par HPLC a été effectuée pour l'extrait au dichlorométhane provenant de la culture de la souche AHO23 sur le milieu ISP2 et après une incubation de 6 jours à 30C°. Les extraits analysés sont concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif à 35°C, récupérés par le méthanol, afin de purifier les composés bioactifs par HPLC (figure 13). Le volume récupéré est filtré par un filtre seringue, puis injecté dans l'HPLC La détection se fait à 220 nm et à 575 nm.

Á 220 nm l'extrait organique de la souche AHO23 a donné 14 pics dont 7 sans colorée. Cinq pics sont majoritaires et neuf pics sont minoritaires. En revanche, une seule fraction (pic 8) est détectée à 450 nm car les fractions non colorées n'absorbent pas à cette longueur d'onde, La détection se fait pendant 60min les résultats obtenus sont illustrés dans la figure 14.

Figure 13 : L'extrait organique obtenu par le dichlorométhane provenant à partir d'une culture de la souche AHO23 sur le milieu ISP2 pendants 6jours.

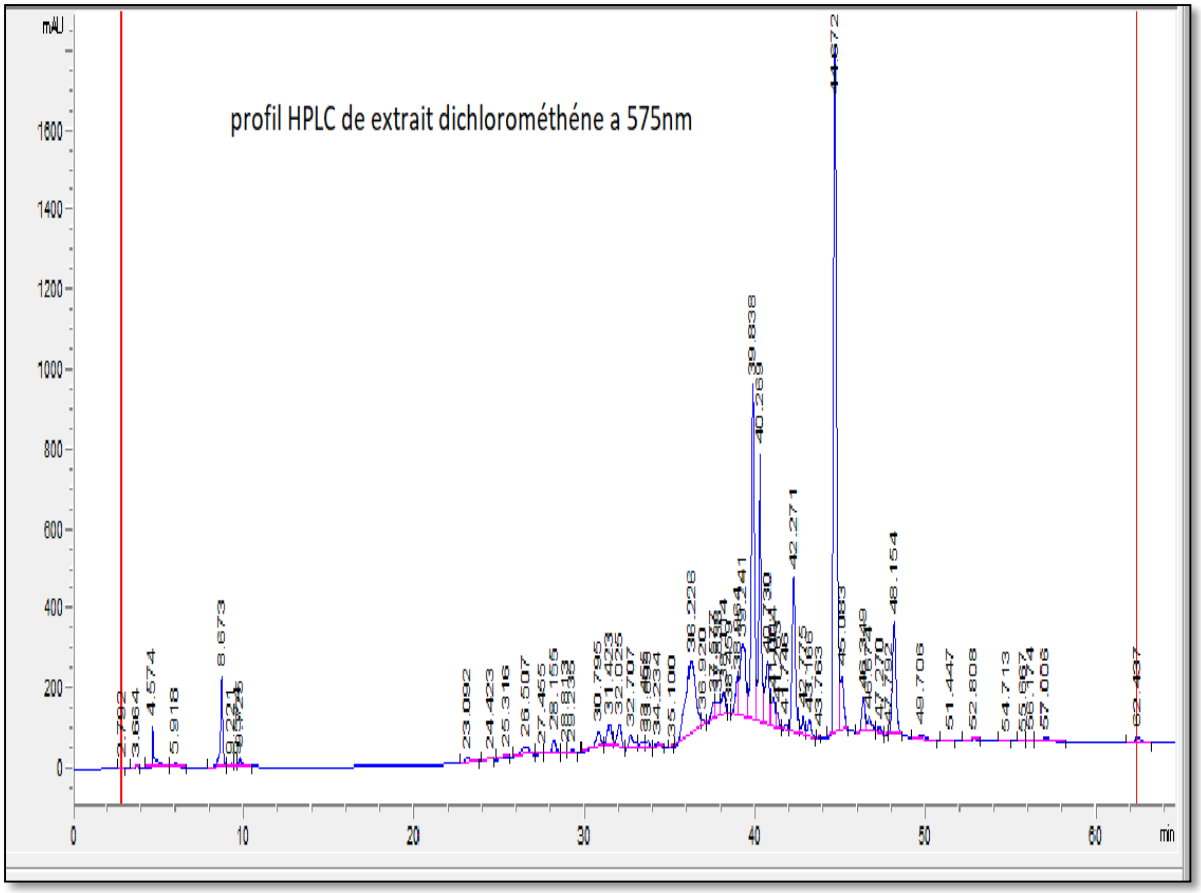

Figure 14 : Profil d'élution en HPLC analytique obtenu à 575 nm de l'extrait au dichlorométhane de la souche AHO23.

IV.3.2. Discussion

L'activité antibiotique des substances secrétées par la souche AHO23 a été mise en évidence dans la phase organique avec l'utilisation de quatre solvants organiques, ces substances actives ont été ensuite récupérées par le méthanol qui présente un pouvoir d'extraction important grâce à sa polarité élevée et permet la faciliter d'extraction à partir du milieu de culture

Le choix du meilleur solvant d'extraction de l'activité antibiotique repose sur le travail du solvant, où il doit extraire une bonne activité antimicrobienne, avec moindre d'impuretés. Tel est le cas pour le dichlorométhane qui s'est avéré d'être le meilleur solvant d'extraction, car il rend le processus de purification par HPLC relativement plus facile **(Lamari, 2002a ; Zitouni, 2005 ; Merrouche, 2012).** Par rapport au butanol qui rend les purifications et la récupération des résidus par le méthanol plus difficiles, avec beaucoup d'impuretés **(Zitouni, 2005 ; Boudjella, 2007).**

L'analyse par HPLC de l'extrait organique au dichlorométhane de la souche AHO23 a indiqué la présence de 14 pics. Chaque pic peut correspondre à un antibiotique de nature

chimique différente. En effet, plusieurs études ont montrés que les espèces d'actinobactéries appartenant au genre *Saccharothrix* ont la capacité de produire un grand nombre d'antibiotiques, telle que *Saccharothrix algeriensis* qui produit plus d'une vingtaine de molécules d'antibiotiques appartenant à la famille des dithiolopyrrolones **(Lamari *et al*., 2002 ; Merrouche *et al*., 2010 et Merrouche *et al*. 2011).**

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans nos jours, l'intérêt à découvrir des solutions efficaces au phénomène de multi résistance des microorganismes pathogènes pour l'homme et d'autres êtres vivants est plus urgent que contrôler la propagation de ces microorganismes multi résistants. Ce qui nécessite la découverte de nouveaux antibiotiques. Les actinobactéries mycéliennes constituent une source très importante en antibiotiques notamment ceux apparentent à des genres rares ou peu fréquents et provenant des environnements extrêmes et particuliers, tels que le genre *Saccharothrix.*

Le présent travail qui rentre dans le cadre d'un axe de recherche du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger, vise à étudier le pouvoir antagonisme et la production des antibiotiques à partir de la souche AHO23 provenant des sols non exploités de la région de Tamanrasset.

Les résultats des tests phénotypiques (macromorphologique et micromorphologique) ainsi que l'ensemble des critères physiologiques et génomiques ont permis d'affilier la souche AHO23 au genre *Saccharothrix*. Avec des taux de similarités compris entre 97 et 99,64 % selon les espèces. La souche la plus proche étant *Saccharothrix xinjiangensis* avec un pourcentage de similarité de 99,64 %.

Les résultats de l'antagonisme ont montré que notre souche (AHO23) présente une bonne activité contre différentes bactéries pathogènes *Listeria monocytogenes* (30mm), *Bacillus subtilis* (34mm), *Escherichia coli* (34mm) et une bonne activité contre quelques champignons *Fusarium culmorum* (36mm), *Penicillium glabrum* (30mm), *Aspergillus westerdijkiae* (26mm).

Les résultats obtenus lors des cinétiques de production des antibiotiques de la souche AHO23 sur les différents milieux de culture ont montré qu'une meilleure activité contre les germes cibles a été enregistrée sur les milieux ISP2 et MS-dextrine liquides. La croissance est diauxique sur le milieu ISP2 et la production maximale des antibiotiques est obtenue durant la phase exponentielle et la phase de déclin (entre le 6^{éme} et le 9 ^{éme} jour). Donc le milieu ISP2 est retenu pour la production finale des antibiotiques, lesquels ont été extraits par le dichlorométhane qui a été sélectionné comme le meilleur solvant d'extraction et de purification des molécules actives.

L'analyse par HPLC a révélé quatorze piques antibiotiques, dont quelques-uns sont antibactériens et d'autres sont antifongiques ou les deux à la fois.

Notre travail représente une première ébauche sur la production des antibiotiques par la souche *Saccharothrix* sp. (AHO23), et qui mérite d'être exploitée, poursuivie et approfondie.

Les perspectives de cette étude sont multiples, dont les principales peuvent être résumées ci-après :

- Elargir le nombre et la gamme des germes cibles (bactéries et champignons), ainsi que la mise en évidence d'autres activités biologiques telles que (les activités antiparasitaires, antivirales et antitumorales,…etc.).
- La réalisation de certains tests complémentaires pour déterminer par exemple la toxicité, la perméabilité, la solubilité,…etc, des antibiotiques sécrétés.
- Purification des différents piques obtenus, faire l'activité anti-biographie et définie leur structures chimiques (spectroscopie UV-VIS, Spectroscopie IR, la RMN et la spectrométrie de masse).
- Détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI).

Références bibliographiques

A-

- **Ababutain, I. M., Zeinab, K., Abdul, A. and Nijla, A. A. (2013).** Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by Streptomyces Sp. Isolated from Saudi Arabia Soil. *International Research Journal of Microbiology (IRJM).*, 4(8) : 179-187.
- **Abriche, A. et Benamira M. (2018).** Etude de l'activité antibactérienne d'une collection d'actinomycètes Thermophiles et étude prospective de l'antibiose de certains aliments commercialisés en Algérie. Mémoire de Master en Ecologie Microbienne. Université des Frères Mentouri, Constantine.3-67p.
- **Afroune, S. et Barache, Y. (2014).** Criblage des paramètres de culture influents sur la production d'antibiotiques par une souche d'actinomycète par un plan d'expérience de Plackett et Burman. Mémoire de Master en Biotechnologie Microbienne. Université Abderrahmane Mira, Bejaïa.64p.
- **Agoulmine, I. (2019).** Identification phylogénétique de quelques actinobactéries des sols sahariens et potentiel antagoniste contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Université Djilali Bounaama, Khemis Miliana.4-39p.
- **Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Klenk, H., Clément, C., Ouhdouch, Y.et van Wezel, G. (2016).** Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*., 80 (01) :1-43.
- **Aouiche, A., Sabaou, N., Meklat, A., Zitouni, A., Bijani, C., Mathieu, F. & Lebrihi, A. (2012).** *Saccharothrix sp*. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. World *J. Microbiol. Biotechnol*., 28: 943–951.
- **Aouiche, A. (2013).** Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxinogènes pour l'homme. Thèse de Doctorat. École Normale Supérieure de Kouba, Alger. 159 p.
- **Arab, S .et Kabaz, N. (2018).** Effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques par la souche TAS18 *d'Actinomadura sp*. isolée d'un sédiment marin de Tipaza. Mémoire de Master en Microbiologie appliquée. Université Saad Dahleb, Blida.54p.

- **Asselineau, J. et Zalta, J. P. (1973).** Les antibiotiques : structure et exemples de mode d'action. Hermine, Paris. 364 p.
- **Aszalos, A. (1986).** Modern analysis of antibiotics. Drugs and the pharmaceutical sceineces. Vol.27. Ed, Marcel Dekker, Inc.
- **Awad, G. (2005).** Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux metabolites secondaires chez *Aspergillus ochraceusnon* producteur de l'ochratoxine A. Thèse de Doctorat en Génie des Procédes. L'institut National Polytechnique de Toulouse, France. 175p.

-B-

- **Badji, B(2006).** Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomurea*. Thèse de doctorat. Université Mouloud Mammeri, Tizi-Ouzou.226 P.
- **Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A.et Sabaou, N. (2005).** Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Mycol.Méd*, .15(4) :211- 219.
- **Badji, B., Mostefaoui, A., Sabaou, N., Lebrihi, A., Mathieu, F., Seguin, E. & Tillequin, F. (2007).**Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea sp*. NM94. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol*., 34: 403–412.
- **Baoxin, Z., Xiangjing, W. and Wensheng, X. (2011).** Optimization of fermentation medium for enhanced production of milbemycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1 using response surface methodology.*African Journal of Biotechnology*., 10: 7225-7235.
- **Barrett, D. (2002).** From natural products to clinically useful antifungals. *Biochemica.Biophysica Acta*., 1587 :224-233.
- **Belferkh, A Megoura, M. (2016).** Isolement des actinomycètes à partir d'un sol Saharien et d'une Sebkha de la région d'El-Oued et mise en évidence de leur capacité à dégrader quelques pesticides. Mémoire de Master en Microbiologie Générale et Biologie moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri, Constantine.p12-41.
- **Belyagoubi, L. (2014).** Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens .Thèse de Doctorat en Biologie. Université Aboubakr Belkaïd, Tlemcen. 9-145p.

- **Ben Mahrez, S et Ikhlef, N. (2015).** Optimisation des paramètres de la production d'antibiotiques par une souche d'actinomycète en utilisant un plan d'expérience. Mémoire de Master en Biotechnologie Microbienne. Université Abderrahmane Mira, Bejaia. 47p.
- **Benaissa Yahia, K et Boufetta, K. (2018).** Production d'antibiotiques antibactériens par la souche TAM13 de *Saccharothrix sp.* isolée d'un sol de la région de Tamanrasset. Mémoire de Master en Microbiologie. Université Saad Dahleb, Blida 1. 6-42p.
- **Bendris, O. et Yous, K. (2017).** Mise en évidence d'activités biologiques d'une souche d'actinomycète isolée de sédiments marins. Mémoire de Master en Sciences Biologiques. Université Abderrahmane Mira, Bejaia.3-37p.
- **Bezari, H et Ouali, F.Z. (2016).** Mise en évidence et amélioration de la production de molécules bioactives d'une souche d'actinobactérie *Saccharotrix tamanrassentensis* SA198 isolée d'un sol saharien. Mémoire de Master en Microbiologie et Bactériologie. Université de Blida.7-65p.
- **Boubetra, D. (2013).** Nouvelles espèces de Saccharothrix isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par *Saccharothrix SP*. SA198.Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, Alger.26-140p.
- **Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Sproer, C., Klenk, H.P.et Sabaou, N. (2013b).** *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 63 :549–553.
- **Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Mathieu, F., Lebrihi, A., Schumann, P., Sabaou, N. (2013a).** *Saccharothrix saharensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*., 63(10) : 3744–3749.
- **Boubetra, D., Zitouni, A., Bouras, N., Schumann, P., Spröer, C., Klenk, H., & Sabaou, N. (2015).** *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*., 65 :1316–1320.
- **Boudekique, K et Cedah, M. (2016).** Étude de quelques activités enzymatiques d'une collection d'actinomycètes. Mémoire de Master en Microbiologie Générale et Biologie Moléculaire des Microorganismes. Université des Frères Mentouri, Constantine. 52 p.
- **Boudjella, H. (1994).** Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces

d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Mémoire de Magistère en Microbiologie. École Normale Supérieure de Kouba, Alger. 177 p.

- **Boudjella, H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des Streptosporangium des sols sahariens et caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par trois souches. Thèse de Doctorat. Institut National Agronomique, El-Harrach (Alger). 177p.
- **Bouras, N. (2005).** Régulation de la production d'antibiotiques Dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix Algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat en Sciences des procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 238 p.
- **Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006).** Effect of amino acids containing sulfur on dithiolopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B- 24137. *J. Appl. Microbiol*., 100, 390-397.
- **Bouznada, A. K., Bouras, N., Mokrane, S., & Chaabane, F. (2016).** *Saccharothrix isguenensis sp*. nov., an actinobacterium isolated from desert soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*., 66(11) :4785–4790.
- **Bouznada, K., Bouras, N., Mokrane, S., Chaabane Chaouch, F., Zitouni, A., Pöter, G., Sabaou, N. (2017).** *Saccharothrix ghardaiensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 110(3) :399–405.
- **Bouznada, K. (2018).** *Saccharothrix* et genres apparentés des sols de la région du M'zab : isolement, taxonomie, mise en évidence de nouvelles espèces et production d'antibiotiques contre divers microorganismes pathogènes. Thèse de doctorat, École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger.252 p.
- **Breton, A., Theilleux, J., Sanglier, J. J. and Vobi G. (1989).** Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie. In : Biotechnologie des antibiotiques. Larpent J. P., et Sanglier J. J. (Eds.). Paris, Masson, pp. 33-70.
- **Bush, B.D., Fitchett, G.V., Gates, D. A. and Langley D. (1993).** Carbocyclic nucleosides from species of *Saccharothrix*. *Phytochemistry.*, 32 :737-739.

-C-

- **Carattoli, A. (2009).** Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae. Antimicrob. Agents Chemother*., 53: 2227–2238.
- **Carattoli A., Miriagou V., Bertini A., Loli A., Colinon C. C., Villa L., Whichard J. M. and Rossolini G. M. (2006).** Replicon typing of plasmids encoding resistance to newer betalactams. *Emerg. Infect. Dis*., 12: 1145-1148.

- **Cavallo, J.D., Fabre, R., Jehl, F., Rapp, C. et Garrabé E. (2004).** Bétalactamines. EMC- Maladies infectieuses., 1:129-202.
- **Coates, A., Hu, Y. (2007).** Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. British Journal of Pharmacology., 152 :1147–1154.
- **Collignon, P. C., Conly, J. M., Andremont, A., McEwen, S. A., Aidara-Kane, A. and Agerso, Y. (2016).** World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine : a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clinical Infectious Diseases.,* 63: 1087-1093.

-D-

- **Dancer, J. E., Hughes, R. G. and Lindell S. D. (1997).** Adenosine-5' phosphate deaminase, a novel herbicide target. *Plant Physiol*., 114 : 119-129.
- **Delaunay, S., Rondags, E. et Germain, P. (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires. *génie de la réaction chimique* J6008 (1-12).
- **Demain, A.L. (1998).** Induction of microbial secondary metabolism. *Internatl. Microbiol*., 1 :259-264.
- **Demain A.L., Aharanowitz Y. and Martin J.F. (1983).** Metabolite control of secondry biosynthetic patheways. *In* : Vining (Ed.) Biochemistry and genectic regulation of commercially important antibiotics. Addison-Wesley, London, p 49-67.
- **Djebbah, F.Z. (2016).** Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema). Mémoire de Master en Microbiologie. Université de Tlemcen. P 9-83 p.
- **Djinni, I., Defant, A., Kecha, M. and Mancini I. (2019).** Actinobacteria Derived from Algerian Ecosystems as a Prominent Source of Antimicrobial Molecules. *Antibiotics.,* 8:172.
- **Doull, J.C. and Vining, L.C. (1990).** Physiology of antibiotic production in actinomyces and some control mechanisms. *Biotech Adv*., 8 :141-158.
- **Driche, E. H. (2016).** Isolement, taxonomie et caractérisation des molécules bioactives d'actinobactéries des sols sahariens antagonistes de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 162 p

- **Durand, G.A., Raoult, D. and Dubourg, G. (2018).** Antibiotic discovery: History, methods and perspectives, *International Journal of Antimicrobial Agents*., P100.

-E-

- **Elmahdi, I., Baganz, F., Dixon, K., Harrop, T., Sugden, T .et Lye, G. L. (2003).** PH Control in Microwell Fermentations of *S.erythraea* CA340: Influence on Biomass Growth Kinetics and Erythromycin Biosynthesis. *Biochem. Eng. J. Gen. Microbiol*., 16(3) : 299-310.

-F-

- **Felsenstein, J. (1981).** Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol*., 17: 368–376.
- **Felsenstein, J. (1985).** Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783.

-G-

- **Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X., Liu X., Zhou Y., Zhang W. and Zhang L. (2009).** Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. Bioresource. Technol., 100 : 4012-4016.
- **Genilloud O., González I., Salazar O., Martín J., Tormo J.R. & Vicente F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*., 38 :375–389.
- **George, M., Anjumol, A., George, G. & Mohamed Hatha, A. A. (2012).** Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr. J. Microbiol. Res*., 6.
- **Gesheva, V., Ivanova, V. et Gesheva, R. (2005).** Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by Streptomyces hygroscopicus. *Microbiological Research*., 160 : 243-248.
- **Gewirtz, D. A. (1999).** A Critical Evaluation of the Mechanisms of Action Proposed for the Antitumor Effects of the Anthracycline Antibiotics Adriamycin and Daunorubicin. *Biochemical Pharmacology*., 57: 727-741.
- **Ghannoum, M. A. and Rice, L. B. (1999).** Antifungal agents: mode of action, mechanisms of resistance, and correlation of these mechanisms with bacterial resistance. *Clin Microbiol Rev.*, 12: 501-517.

- **Goodfellow, M., Kâmpfer, P., Busse, H.J., Trujillo, M.E., Suzuki, K., Ludwig, W.et Withman, W.B. (2012).** Bergey Manuel of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria (2èmeEds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London p. 2083.
- **Goodfellow, M.et Williams, S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annal Review of Microbiology.*, 37 : 189-216.
- **Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. & Pang, C. H.-N. (1974).** *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the *nocardin* Strain. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 24: 54–63.
- **Grund, E. and Kroppenstedt, R.M. (1990).** Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiopsis Meyer* 1976. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 40(1) :5–11.
- **Guardabassi, L.et Courvalin. (2006).** Modes of antimicrobial action and mechanisms of bacterial resistance. In: Aarestrup F.M. (Ed.), Antimicrobial resistance in bacteria of animal origin. ASM Press : Washington, 1-18.
- **Gupta, R. S. (2011).** Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*, 100: 171–182.

-H-

- **Habibeche, L. (2012).** Isolement et sélection de souche d'actinomycètes productrices d'antibiotique. Mémoire de Master en Biotechnologie Microbienne. Université Abderrahmane Mira, Bejaia. 41 p.
- **Hamdar, A. (2018).** Procédés innovants pour la production de dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat en Ingénieries Microbienne et Enzymatique. Université Toulouse III, Paul Sabatier. 06-170 p.
- **Hamedi, J., Carmen Montero-Calasanz, M. del, Spröer, C., Mohammadi panah, F., Klenk, H.-P. & Schumann, P. (2015).** *Saccharothrix ecbatanensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 65(12):4544–4549.
- **Harir, M. (2018).**Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactéries isolées des sols arides et semi arides d'Algérie. Thèse de Doctorat en Intérêt des microorganismes en Agriculture et en Agroalimentaire. Université Ahmed Ben Bella, Oran. 181 p.

- **Hozzein, W. N., Li, W. J., Ali, M. I. A., Hammouda, O., Mousa, A. S., Xu, L. H. & Jiang, C. L. (2004).** *Nocardiopsis alkaliphila sp*. nov., a novel alkaliphilic actinomycete isolated from desert soil in Egypt. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*., 54(1) : 247–252.
- **Hussein, E.I., Jacob, J.H., Shakhatreh, M.K., Abd Al-Razaq, M.A., Juhmani, A.F. & Cornelison C.T. (2018).** Detection of antibiotic-producing Actinobacteria in the sediment and water of Ma'in thermal springs (Jordan). *Germs*., 8(4) :191-198.

-I-

Isshiki, K., Sawa, T., Naganawa, H., Matsuda, N., Hattori, S., Hamada, M., Takeuchi, T., Oosono, M., Ishizuka, M. & other authors. (1989). 3-O-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-Oisobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 42: 467–469.

-J-

- **Jensen, H.L. (1931).** Proc. Linnean Soc. N. S. Wales, 56, 334–370.
- **Joffin, J.N. and Leyral, G. (2014).** Microbiologie technique -Tome 1 : Dictionnaire des techniques. CRDP d'Aquitaine. 368 p.
- Jukes, T. H. & Cantor, C. R. (1969). Evolution of Protein Molecules. In *Mamm. Protein Metab*., pp. 21–132. Elsevier.

-K-

- **Kalinovskaya, N. I., Kalinovsky, A. I., Romanenko, L. A., Dmitrenok, P. S. & Kuznetsova, T. A. (2010).** New angucyclines and antimicrobial diketopiperazines from the marine mollusk-derived actinomycete *Saccharothrix espanaensis* An 113. *Nat. Prod. Commun*., 5: 597–602.
- **Khaliq, S., Ghauri, M. A. and Akhtar, K. (2013).** Isolation, identification and optimization of fermentation parameters for improved production of antimicrobial compounds from indigenous Streptomyces isolates. African Journal of Microbiology Research., 7(18) : 1874-1887.
- **Kim, B.Y., Brown, R., Labeda, D.P. & Goodfellow, M. (2011)**.Reclassification of *'Dactylosporangium variesporum'* as *Saccharothrix variisporea* corrig. (ex Tomita et al. 1977) sp. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*., 61 :310–314.
- **Kim, O.S., Cho, Y.J., Lee, K., Yoon, S.H., Kim, M., Na, H., Park, S.C., Jeon, Y. S., Lee, J.H. & other authors. (2012).** Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA

gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol*., 62: 716–721.

- **Kinoshita, N., Igarashi, M., Ikeno, S., Hori, M. & Hamada, M. (1999).** *Saccharothrix tangerinus sp*.nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomycetologica*, 13: 20–31.
- **Koguchi, Y., Khono, J., Suzuki, S., Takahashi, K., Ohnuki, T. and Komatsubara, S. (1999).** TMC86A, B and TMC-96, new proteasome inhibitors from *Streptomyces sp*. TC 1084 and *Saccharothrix sp*. TC 1094. I. Taxonomy, fermentation, isolation, and biological activities. *J. Antibiot. Tokyo.*, 52(1 2) :1069-76.
- **Koussa, W., Kermia, L.et Izouine, F. (2019).** Germes isolés en hémocultures et leurs résistances aux antibiotiques durant l'année 2018. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. 121 p.

-ℒ-

- **Labeda, D. P. and Kroppenstedt, R. M. (2006).** Goodfellowia gen. nov., a new genus of the *Pseudonocardineae* related to *Actinoalloteichus*, containing *Goodfellowia coeruleoviolacea* gen. nov., comb. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 56 : 1203-1207.
- **Labeda, D. P., Hatano, K., Kroppenstedt, R. M. and Tamura T. (2001).** Revival of the genus *Lentzea* and proposal for *Lechevalieria* gen. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 51: 1045-1050.
- **Labeda, D.P. and Kroppenstedt, R.M. (2000).** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and related taxa: proposal for Actinosynnemataceae fam. nov. Int. J. Sy st. Evol. Microbiol., 50 : 33 1-336.
- **Labeda, D.P. and Lyons, A.J. (1989).** *Saccharothrix texasensis sp.* nov. and *Saccharothrix waywayandensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*., 39(3) :355–358.
- **Labeda, D.P., and Lechevalier, M.P. (1989).** Amendment of the genus *Saccharothrix* Labeda et al. 19 84 and descriptions of *Saccharothrix espanaensis* sp. nov., *Saccharothrix cryophilis* sp. nov., and *Saccharothrix mutabilis* comb. nov. International Journal of Systematic Bacteriology., 39 (4) : 420–423.
- **Labeda, D.P., Testa, R.T., Lechevalier, M.P. & Lechevalier, H.A. (1984).** *Saccharothrix*, a new genus of the Actinomycetales related to *Nocardiopsis*. *Int. J. Syst. Bacteriol*., 34(4) :426-431.

- **Lahoum, A. (2017).** Souches d'actinobactéries mycéliennes des sols sahariens: mise en évidence de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques et réduction de la concentration en aflatoxine B1.Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 269 p.
- **Lalaoui, W. (2012).** Influence de quelques milieux de culture sur la production d'antibiotiques par une souche de Streptomyces isolée d'un sol Saharien. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée à l'agroalimentaire, biomédical et à l'environnement. Université Abderrahmane Mira, Bejaia. 77 p.
- **Lamari, L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Université de Tizi Ouzou (Algérie). 186 p.
- **Lamari, L., Zitouni, A., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Lebrihi, A., Lefebvre, G., Seguin, E. and Til, F. (2002a).** New Dithiolopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix sp.* SA 233.I.Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiotics*., 55 : 696-701.
- **Lamari, L., Zitouni, A., Dob, T., Sabaou, N., Lebrihi, A., Germain, P., Seguin, E. and Tillequin, F. (2002b).** New Dithiolopyrrolone Antibiotics from *Saccharothrix sp*. SA 233. II. Physicochemical Properties and Structure Elucidation.J. *Antibiotics.*, 55: 702-706.
- **Larpent, J. P. and Larpent-Gaurgaud, M. (1997).** Memento technique de microbiologie. Edition Lavoisier., 1039 p.
- **Larpent, J.P.et Sanglier, J.J. (1989).** Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, p. 481.
- **Larpent-Gourgaud, M. et Sanglier, J.J. (1992).** Biotechnologie. Principes et méthodes. Doin éditeurs. Paris. France.
- **Laskin, A.I., and Lechevalier, H. (1984).** Handbook of Microbiology. Vol. 3, CRC Press.Laurent F.J., Provost F., and Boiron P. (1999). Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol*., 37 : 99-102.
- **Lazzarini, A., Cavaletti, L., Toppo, G. and Marinelli, F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek*., 78 : 399-405.

- **Lebrihi, A., Lamasaif, D., Lefebvre, G. and Germain, P. (1992).** Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*.Appl. *Microbiol. Biotechnol*., 37: 382-387.
- **Lieske, R., (1921).** Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Lipsia.
- **Locci, R. and Sharples, G.P. (1984).** - Morphology. ln : «The biology of Actinomycetes ». Goodfellow, M., Mordarski, M., Williams, S.T. Eds. Academic Press, London. pp. 165-199.
- **Loucif, L. (2006).** Recherche des souches d'actinomycètes productrices de molécules antibactériennes « Cas des eaux du lac Oubeira d'El Kala ».Magister en Microbiologie. Université Badji Mokhtar, Annaba. 203 p.
- **Lozniewski, A.et RABAUD, C. (2010).** Résistance Bactérienne Aux Antibiotiques. Fiches conseils pour la prévention du risque infectieux – Infections associées aux soins CCLIN Sud-est. Nancy, 4p.
- **Lu, S., Xie, B., Liu, B., Lu, B. and Xing, D. (2019).** Neglected effects of inoculum preservation on the Start-Up of psychrophilic bioelectrochemical systems and shaping bacterial communities at low temperature. *Frontiers in Microbiology*., 10 : 935.

-M-

- **Meklat A. (2012).** Taxonomie et potentiel antagoniste des actinobactéries halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces *d'Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat en Sciences biologiques. Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 162 p.
- **Maltezou, H. C. (2008).** β-lactamases in Gram-negative bacteria : introducing the era of panresistance.*Int J Antimicrob Agents.,* 33(5) : 405-407.
- **Manikkam, R., Venugopal, G., Ramasamy, B. and Kumar, V. (2015).** Effect of critical medium components and culture conditions on antitubercular pigment production from novel *Streptomyces sp* D25 isolated from Thar desert, Rajasthan.*Journal of Applied Pharmaceutical Science.,* 5: 15-19.
- **Mariat, F. et Sebald, M. (1990).** Actinomycetes In : Bactériologie Médicale. Le Minor L. et véron M. 2éme édition, Flammarion. Paris. p.935-949.
- **Martin, J.F. et Demain, A.C. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. Microbiological Reviews., 44 : 230-251.
- **Matsuo, N., Negishi, A. and Negishi, Y. (2003).** Jpn. Kokai Tokyo Koho, p 6.

- **Marchal, N. & Bourdon, J. L. (1973).** Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds), Paris, 179 p.
- **Marchal, N., Bourdon, J. L. & Richard, C. (1987).** Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin Press, Paris, France, pp. 67-122.
- **Merizig, H.et Naami, F. (2015).** Etude taxonomique de quelques souches d'actinomycètes isolées de la région d'Ouargla. Mémoire de Master en Microbiologie fondamentale et Appliquée. Université Kasdi Merbah, Ouargla. pp 3-85.
- **Merniez, M. et Merniez, S. (2018).** Etude De La Resistance Aux Antibiotiques Des Souches *D'Escherichia coli* Isolées Du Lait De Vache Commercialise Dans La Région D'Ain M'Lila Et Ain Fakroun. Mémoire de Master en Microbiologie Appliquée. Université Larbi Ben M'hidi Oum El Bouaghi.65 p.
- **Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Monje, M.-C., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2010)**. Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis. J. Nat. Prod*., 73: 1164–1166.
- **Merrouche, R. (2012).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des dithiolopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* après addition de précurseurs dans le milieu de culture. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach. 197 p.
- **Merrouche, R., Bouras, N., Coppel, Y., Mathieu, F., Sabaou, N. & Lebrihi, A. (2011).** New dithiolopyrrolone antibiotics induced by adding sorbic acid to the culture medium of *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *FEMS Microbiol. Lett*., 318: 41–46.
- **Moulin, M. et Coquerel, A. (1998).** Pharmacologie, connaissances et pratique. 2ème édition, Masson. Paris.
- **Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Kinoshita, T., Miyajima, A., Seto, H. & Hayakawa, Y. (2001b).** Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependent cells from *Saccharothrix* sp. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot*., 54 : 714-717.
- **Murakami, R., Tomikawa, T., Shin-Ya, K., Shinozaki, J., Kajiura, T., Seto, B. & Bayakawa, Y. (2001a).**Ammocidin, a new apoptosis inducer in ras-dependant cells

from *Saccharothrix* sp. I. Production, isolation and biological activity. *J. Antibiot*., 54 : 710-7 13.

- **Murakami, R., Shinozaki, J., Kajiura, T., Kozone, I., Takagi, M., Shin-Ya, K., Seto, H. & Hayakawa, Y. (2009).** Ammocidins B, C and D, new cytotoxic 20-membered macrolides from *Saccharothrix sp*. AJ9571. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 62: 123–127.
- **Muylaert, A. et Mainil, J.G. (2012).** Résistances bactériennes aux antibiotiques : les mécanismes et leur « contagiosité ». *Ann. Méd. Vét*., 156 : 109- 123.

-N-

- **National Center for Biotechnology Information (NCBI)** - Taxonomy. [En ligne] : http://www.ncbi.nlm.nih.gov/taxonomy (consulté le 18 septembre 2018).

-O-

- **Oskay, M. (2011).** Effects of some Environmental Conditions on Biomass and Antimicrobial Metabolite Production by *Streptomyces sp*. KGG32. *International Journal of Agriculture et Biology*., 13(3) : 317-324.
- **Otoguro, M., Tamura, T., Suzuki, K.-I. and Hayakawa, M. (2009).** *Saccharothrix violaceirubra* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 59 :1504–1507.
- **Ouali, F. et Bezari, H. (2016).** Mise en évidence et amélioration de la production de molécules bioactives d'une souche d'actinobactérie *Saccharotrix tamanrassetensis* SA 198 isolée d'un sol saharien. Mémoire de Master en Microbiologie et Bactériologie. Université de Blida. 79 p.
- **Ounadjela F.Z. (2016).** Isolement des microorganismes (actinomycètes et moisissures) producteurs de substances antimicrobiennes à partir du sol d'une grotte dans la région de Tlemcen (Tagema).Mémoire de Master en Microbiologie fondamentale et Appliquée. Université de Tlemcen.10-84 p.

-P-

- **Pandey, A., Chandra, N., Srivastava, A., Kumar, D. & Kumar, S. (2018).** Antimicrobial Metabolites Producing Soil Microorganisms. *Indian Journal of Applied Microbiology.*, 21(01) : 46-57.
- **Pandey A., Shukla A. and Majumdar S.K. (2005).** Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *African J. Biotech*., 4: 909-910.

- **Pfefferle, C., Theobald, U., Gurtler, H. and Fiedler, H. P. (2000).** Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol*., 80(2) : 135-142.
- **Piret, J.M. and Demain, A.L. (1988).** Actinomycetes in biotechnology: an overview in : Goodfellow M., Mordarski M and Williams S.T. (Edn.) Actinomycetes in biotechnology. Academie Press, London, pp 461-482.
- **Powell, N. A. & Roush, W. R. (2001**). Studies on the total synthesis of formamicin: synthesis of the C(1)−C(11) Fragment. *Org. Lett*., 3: 453–456.
- **Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Bacq-Calberg, C.M.et Dusart, J. (2002).** Microbiologie. De Boeck Université. 1147 p.
- **Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. & Woolverton, C. J. (2013).** Microbiologie, 4ème édition. De Boeck Supérieur.

-R-

- **Rafieenia, R. (2013).** Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in Streptomycetes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Heath Sciences*., 3 :810-821.
- **Rossi-Doria, T. (1891).** Ann. Igiene Sper. Roma, 1 (n.s.), 339–428.

-S-

- **Sabaou, N., Hacène, H., Bennadji, A., Bennadji, H. & Bounaga, N. (1992).** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol*., 38: 1066–1073.
- **Sabaou, N., Boudjella, H., Bennadji, A., Mostefaoui, A., Zitouni, A., Lamari, L., Bennadji, H., Lefèbvre, G. & Germain, P. (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*, 9: 147–153.
- **Saitou, N. & Nei, M. (1987).** The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol*., 4: 406–425.
- **Saker, R. (2015).** Recherche de nouveaux taxons d'actinobactéries halophiles des sols sahariens et potentialités antagonistes. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Ferhat Abbas, Sétif. 28-174p.
- **Schippers, A., Bosecker, K., Willscher, S. & Spro, C. (2002).** *Nocardiopsis metallicus sp.* nov., a metal- leaching actinomycete isolated from an. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 2291–2295.

- **Shirling, B. and Gottlieb, D. (1966).** Methods for characterization of Streptomyces species. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 16(3) : 3313-3340.
- **Sierra, G. (1957).** A simple method for the detection of lipolytic activity of micro-organisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. *Antonie van Leeuwenhoek*, 23: 15–22.
- **Singh, M. P., Petersen, P. J., Weiss, W. J., Kong, F. & Greenstein, M. (2000).** Saccharomicins, novel heptadecaglycoside antibiotics produced by *Saccharothrix espanaensis* : antibacterial and mechanistic activities. *Antimicrob. Agents Chemother*., 44: 2154–2159.
- **Singh, N. and Rai, V. (2012).** Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.*, 4: 94-101.
- **Smaoui (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, France. 181p.
- **Solanki R., Khanna M., Lal R. (2008).** Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol*., 48:410–431.
- **Solecka, J., Zajko, J., Postek, M. & Rajnisz, A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sci*., 7.
- **Souagui, Y., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C. and Kecha, M. (2015).** Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces sp*. SY-BS5, using response surface methodology. *Journal of Medical Mycology.*, 25 : 108-115.
- **Spizek, J. and Tichy, P. (1995).** Some aspects of over production of secondary metabolites. *Floia Microbiol*., 40 : 43-50.
- **Strub, C. (2008).** Modélisation et Optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat en Génie des Procédés et de l'Environnement. l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France, P. 203.
- **Sugawara, T., Tanba, T., Kaneda, Y., Yamamoto, H. and Adachi, T. (1999).** Antifungal thiazolylpyridine compound from Saccharothrix species and pharmaceutical compositions containing it. *Jpn. Kokai Tokyo Koho*., p. 10.

- **Sylvie, C. (2009).** La résistance aux antibiotiques : un enjeu de santé publique important. *Pharmactuel*., 42(2) :6-21.

-T-

- **Takahashi, A., Hottan, K., Saito, O., Morioka, M., Okami, Y. & Umezawa, H. (1986).** Production of novel antibiotic, dopsisamine, by a new subspecies of *Nocardiopsis mutabilis* with multiple antibiotic resistance. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 39: 175–183.
- **Takeuchi, M., Takahashi, S., Enokita, R., Sakaida, Y., Haruyama, H., Nakamura, T., Katayama, T. & Inukai, M. (1992).** Galacardins A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)*, 45: 297–305.
- **Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. & Kumar, S. (2016).** MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 6.0. *Mol. Biol. Evol*., 30: 2725–2729.
- **Tata, S. (2020).** Production d'antibiotiques par *Streptomyces sp*. PAL114 en fonction des sources d'azote et de carbone, mise en évidence de nouvelles molécules et activités biologiques. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Ecole Normale Supérieure De Kouba-Alger. 156 p.
- **Tiwari, K. and Gupta, R.K. (2011).** Rare actinomycetes: a potential store house for novel Antibiotics.*Crit. Rev. Biotechnol*., 32 :108-132.
- **Toumatia, O. (2015).** Étude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum* : taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. 266 p.
- **Tomita, K., Oda, N., Hoshino, Y., Ohkusa, N. and Chikazawa, H. (1991).** Fluvirucins AI, A2, BI, B2, B3, B4 and B5, new antibiotics active against influenza A virus. IV. Taxonomy on the producing organisms. *J. Antibiot*. , 44 : 940-8.
- **Tortora, J., Funk, B. F. et Case, Ch. l. (2003).** Introduction à la microbiologie, (edn) ISBN. Canada. 2eme édition : 332.

-V-

- **Van der Heul H.U., Bilyk B.L., McDowall K.J., Seipke R.F. and Van Wezel G.P. (2018).** Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. *Nat. Prod. Rep*., 35 : 575-604.

- **Van Dissel, D. and Wezel, G. P. V. (2017).** Morphology-driven downscaling of Streptomyces lividans to micro-cultivation. *Antonie van Leeuwenhoek*., 1-13.
- **Veyssiere, A. (2019).** La résistance aux antibiotiques des bactéries les plus communément rencontrées dans les infections communautaires état des lieux en 2019. Thèse de Doctorat en pharmacie. Université de Bordeaux. 15-87p.
- **Vertesy L., Barbone F., Cashmen E., Decker H., Ehrlich K., Jordan B., Knauf M., Schummer D., Segeth M., Wink J. and Seibert G. (2001).** Pluraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix sp.* DSM 12931. *J. Antibiot*. 54 :718-29.

-W-

- **Wadetwar, R. N., Chaturvedi, J. L., Building, Z. and Road, H. (2013).** Production of antibiotic from actinomycetes isolated from nagpur. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*., 4: 3094-3098.
- **Waksman, S.A. (1919)**. Soil Sci, 8: 71–215.
- **Waksman, S. A. (1961).** The Actionmycetes. Vol. 2, Classification, identification and descriptions of genera and species. *J. Pharm. Sci*., 50: 979.
- **Wang, Z.-X., Li, S.-M. & Heide, L. (2000).** Identification of the coumermycin A1 biosynthetic gene cluster of *Streptomyces rishiriensis* DSM 40489. *Antimicrob. Agents Chemother*., 44: 3040–3048.
- **Wang, X., Huang, L., Kang, Z., Buchenauer, H. et Gao, X. (2010).** Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015T. *Journal of biomedicine and biotechnology*., 10: 1-10.
- **Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H. J., Trujillo, M., Ludwig, W. and Suzuki, K. (2012).** Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5 : The Actinobacteria. 2ème édition, Springer Science & Business Media, New York.1750 p.
- **Williams L., Stapleton F., Carnt N. (2019).** Microbiology, Lens Care and Maintenance., P65-96.
- **Williams, S.T. and Wellington, E.M.H. (1982a).** Actinomycetes. In : Eds. Page A.L., Miller R.H., Keency O.R : Methods of Soil Analysis, part 2, Chemical and Microbiological Properties, second ed. American. Society of Agronomy/Soil Science Society of America, Madison., 969–987.
- **Williams, S.T., Sharples, G.P. & Bradshow, RM. (1973).** The fine structure of actinomycetales. In : Sykes G. and skinner F. A. (ed). Actinomycetales : characteristics and pratical importance. Academic Press. INC., New York, N. Y., p 113-130.

-y-

- **Yoneyema, H. and Katsumata, R. (2006).** Antibiotic Resistance in Bacteria and its Future for Novel Antibiotic Developpement. *Biosci. Biotechnol. Biochem*., 70 (5) :1060-1075.

-z-

- **Zerizer, H. (2014).** Les genres d'actinomycètes (hors mycobactéries) impliqués dans les infections dans la région de Constantine. Thèse de Doctorat en Biochimie et Microbiologie Appliquées. Université de Constantine. 155 p.
- **Zitouni, A. (1995).** Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens: taxonomie numérique, extraction, purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Mémoire de Magistère. École Normale Supérieure de Kouba, Alger, 177 p.
- **Zitouni, A. (2004).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat, INP-ENSAT, 230 p.
- **Zitouni, A. (2005).** Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix sp*. SA 103. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 230 p.
- **Zitouni, A., Boudjella, H., Lamari, L., Badji, B., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2005).** *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: Isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Research in Microbiology*., 156(10) : 984-993.
- **Zitouni, A., Boudjella, H., Mathieu, F., Sabaou, N. and Lebrihi, A. (2004a).** Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix sp*. SA103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiot*., 57 : 367-372.
- **Zitouni, A., Lamari, L., Boudjella, H., Badji, B., Sabaou, N., Gaouar, A. and Labeda, D. P. (2004b).***Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 54(4) : 1377–1381.

Annexes

ANNEXE N°1

Matériels et appareillages

1. Matériel léger a utilisation habituelle dans les laboratoires

- Balance analytique «KERN », Bec Bunsen, Micropipette. (100, 1000 µL.), Plaques agitatrices chauffantes « VELP SCIENTIFICA », Vortex « Techno Kartell ».
- **Verreries et matérielles consommable** : Ampoule à décanter, erlenmeyer (250 et 500ml), bécher, Tubes à hémolyse, boite pétri, porte pièce, Tubes d'eppendorf, disque papier wattman.

2. Matériel lourd à utilisation spécialisée

L'appareil d'HPLC utilisé dans notre travail est équipé par les éléments suivants :

- Un injecteur de type (auto-sampler G1329B) relié à une boucle d'injection de 100 µL.
- Un dégazeur.
- Un système de pompe G1311C à 4 voies accompagné d'un mélangeur G1316A.
- Un détecteur (UV-Vis G1315D) à barrette de diode à longueur d'onde UV-visible variable.
- Une colonne en phase inverse C18 (Zorbax SB-C18, 250 mm × 9,4 mm, 5 µm de granulométrie). Cette colonne est précédée d'une pré-colonne contenant la même phase stationnaire.
- Une chambre thermostatée.
- Un contrôleur de gradient du solvant d'élution.
- La collection des données et l'intégration des pics sont assurées par un ordinateur équipé du logiciel d'exploitation et d'analyse Agilent Chem Station (Rev. B 04.03).

Matériel lourd à utilisation spécialisée.

Figure 15 : PH mètre (HANA pH211)	**Figure 16 :** Autoclave (pbi 96 de 65 litre)	**Figure 17:** Centrifugeuse (Jouan E96)
Figure 18 : Rotavapeur (Stuart)	**Figure 19 :** HPLC (Agilent®1260)	**Figure 20 :** Etuve (Memmert)
Figure 21 : Microcentrifuge des eppendorfs (Sigma)	**Figure 22 :** Shaker New (Brunswick Scientific)	**Figure 23:** Four Pasteur (Memmert)

ANNEXE N°2

MILIEUX DE CULTURE

1. Milieux d'isolements

Milieu chitine-vitamines B (Hayakawa et Nonomura, 1987)

Chitine: 2 g; K2HPO4: 0,35 g; KH2PO4: 0,15 g; MgSO4, 7H2O: 0,2 g; NaCl: 0,3 g ; CaCO3:0,02 g; FeSO4, 7H2O: 10 mg; ZnSO4, 7H2O: 1 mg; MnC12, 4H2O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée, q.s.p. 1000 ml ; pH= 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés :

- Les vitamines : thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium : à raison de 0,5 mg/L et biotine : 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées à l'éther puis dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.
- Une solution stérile d'un antifongique, le cycloheximide (ou actidione) à 80 mg/L.
- Une solution stérile d'un acide nalidixique (anti Gram négative) à raison de 50 mg/l

2. Milieux pour l'identification de l'isolat AHO23

1.1. Étude morphologique

Milieux ISP2 et ISP4 préconisés lors de l'"International Streptomyces Project"**(Shirling et Gottlieb, 1966)** et le milieu CHV sans agents sélective **(Hayakawa et Nonomura, 1987).**

1.1.1. Milieu ISP2 (extrait de levure-extrait de malt agar)

Glucose : 4 g ; extrait de levure : 4 g ; extrait de malt : 10 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; agar : 20 g ; pH 7,2.

1.1.2. Milieu ISP4 (amidon-sels minéraux agar)

Amidon: 10 g; K2HPO4: 1 g; MgSO4,7H2O: 1 g; NaCl: 1 g; (NH4)2SO4: 2 g; CaCO3: 2 g; solution saline standard (voir ISP3): 1 ml ; agar: 20 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; pH=7,2.

1.1.3. Milieu chitine-vitamines B (Hayakawa et Nonomura, 1987) sans agents sélective

1.2. Étude physiologique

1.2.1. Utilisation des glucides comme seules sources de carbone (Gordon et *al.*, 1974)

- **Milieu minéral de base** : (NH4)2HPO4 : 1 g ; KCl : 0,02 g ; MgSO4, 7H2O : 0,2 g ; agar : 15 g ; eau distillée q.s.p. 1000 ml ; pH = 7,2.

- **Le sucre :** est ajouté à raison de 10 g/l et sont stérilisés à l'éther pendant une nuit et sans dégradé avant d'être ajoutés séparément et aseptiquement.(adonitol, L-arabinose, D-cellobiose, Dfructose, D-galactose, D-glucose, *myo*-inositol, D-lactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, Dmélibiose, a méthyle D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, saccharose, D-sorbitol, Dtréhalose et D-xylose)
- **Le rouge de phénol :** est utilisé comme un indicateur de ph, du rouge-orangé (pH neutre) au jaune (pH acide).
- **Milieu de base :** contenant le rouge de phénol à 0,12 % et à pH 7,5 (milieu coloré en rouge-rose). Un témoin sans source de carbone a été aussi réalisé. Les souches ont été ensemencées en stries serrées et incubées à 30 °C (pendant 1 à 2 semaines).
- Le test est considéré comme positif lorsque la croissance est meilleure que celle observée sur le milieu témoin (sans source de carbone) dans lequel la croissance de la souche est soit à l'état de traces, soit absente. La dégradation est également notée positivement après virage de l'indicateur coloré du rouge-rose au jaune

1.2.2. Dégradation de divers composés organiques

1.2.2.1. Dégradation de l'adénine, de la guanine, de la tyrosine, de l'hypoxanthine et de la xanthine (Gordon et *al.*, 1974)

Le milieu de base utilisé est la gélose nutritive

La composition du Gélose nutritive (GN) : Peptone: 5 g; extrait de viande: 1 g; extrait de levure: 2 g; NaCl: 5 g; agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH 7,5.

0,4 g de chaque composé (sauf pour la guanine 0,2 g) est suspendu dans 10 ml d'eau distillée stérile. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive stérile et maintenue en surfusion à 45 °C. Après refroidissement du milieu, l'isolat de la souche AHO23 a été ensemencé par point et en double (deux points par isolat). La dégradation se manifeste par une auréole claire autour des colonies.

1.2.2.2. Dégradation de l'amidon (Marchal et Bourdon, 1973)

2,5 g d'amidon sont dissout dans 250 ml de gélose nutritive puis stérilisés à l'autoclave.

Le milieu est coulé dans des boîtes de Pétri stériles. L'ensemencent (par point) et les conditions d'incubation sont identiques à ceux cités dans le paragraphe précédent. Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation de l'amidon.

1.2.2.3. Dégradation de la gélatine (Marchal et Bourdon, 1973)

4 g de gélatine sont ajoutés dans 100 mL de gélose nutritive. L'ensemencent (par point) et les conditions d'incubation sont identiques à ceux cités dans les deux paragraphes précédents. Après croissance, le réactif de Frazier est ajouté sur les colonies et le milieu. Ce réactif permet de mettre en évidence la dégradation de la gélatine (auréole claire autour des colonies).

1.2.2.4. Dégradation de la caséine du lait (Gordon et *al.*, 1974)

10 g de lait en poudre écrémé sont dissout dans 100 ml d'eau distillée, puis stérilisés à l'autoclave. Une quantité de 100 ml d'eau distillée contenant 3,6 g d'agar est parallèlement autoclavé. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

1.2.2.5. Dégradation de l'esculine et de l'arbutine (Marchal et *al.*, 1987)

Esculine (et /ou arbutine) : 1 g ; citrate de fer ammoniacal : 1 g ; peptone : 10 g ; agar : 18 g ; eau distillée : q.s.p. 1000 mL. PH 7,5. L'ensemencement d'isolat de la souche se fait par points (en double). La dégradation de ces deux hétérosides se manifeste par l'apparition d'un pigment brun foncé à noir autour des colonies.

1.2.2.6. Dégradation du Tween 80 (Sierra, 1957)

Tween 80: 10 ml; NaNO3 : 1 g; extrait de levure: 5 g; solution saline (*): 50 ml; CaC12, 2H2O: 0,1 g; eau distillée q.s.p. 1000 ml; agar: 18 g ; pH=7,5.

(*) Solution saline standard : K2HPO4 : 0,25 g ; MgSO4, 7H2O : 0,125 g ; FeSO4, 7H2O : 0,001 g ; MnSO4 : 0,001 g ; eau distillée q.s.p. 50 ml.

L'ensemencement d'isolat se fait par point (en double). La dégradation du Tween 80 se manifeste par une auréole opaque autour des colonies.

1.2.3. Réduction des nitrates (Marchal et Bourdon, 1973)

Milieu nitrate : peptone : 5 g ; extrait de viande : 3 g ; KNO3 : 1 g ; eau distillée q.s.p. 1000 mL. pH = 7,2.

Ce test consiste à mettre en évidence la présence ou non dans le milieu de culture des nitrites (NO2) issus de la réduction des nitrates (NO3) par les nitrates réductases.

Après ensemencement et croissance d'isolat, la recherche du nitrate réductase est effectuée en utilisant le réactif de Griess.

1.2.4. Production de pigments mélanoïdes

1.2.4.1. Milieu ISP 6 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Peptone: 20 g; citrate ferrique ammoniacal: 0,5 g; K2HPO4: 1 g; thiosulfate de sodium: 0,08 g; extrait de levure: 1 g; agar: 15 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH 7,2.

1.2.4.2. Milieu ISP 7 (Shirling et Gottlieb, 1966)

Glycérol: 15 g; L-tyrosine: 0,5 g; L-asparagine: 1 g; K2HPO4: 0,5 g; MgSO4,7H2O: 0,5 g; NaCl: 0,5 g; FeSO4, 7H2O: 0,01 g; solution saline standard (voir ISP 3): 1 ml; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH =7,2.

1.3. Identification moléculaire

1. Extraction et quantification de l'ADN génomique

Les souches sélectionnées sont ensemencées en stries espacées sur boîtes de Pétri contenant de l'ISP 2 solide. L'ADN est extrait selon la méthode de **Liu *et al.* (2000)** comme suit : des colonies jeunes, bien isolées, sont prélevées aseptiquement à l'aide d'une lame bistouri stérile et transférée dans des tubes Eppendorf stériles de 1,5 mL. La biomasse ainsi prélevée est mise en suspension dans 500 µL d'une solution de lyse, préalablement stérilisée par filtration, et composée de 400 mM de tris HCl (pH=8), 60 mM d'EDTA (pH=8), 150 mM de NaCl et 1 % de sulfate de sodium dodecyl (SDS).

Après incubation pendant 15 min à température ambiante, le contenu des eppendorfs est mélangé avec 150 µL d'une solution à pH= 4,8 composée d'acétate de potassium à 5 M et de 11,5 % d'acide acétique glacial.

Le mélange obtenu est vortexé brièvement puis centrifugé une minute à 12000 *rpm*. Un volume de 400 µL de surnageant est récupéré et transféré dans un autre tube Eppendorf stérile, puis additionné d'un même volume d'isopropanol et mélangé brièvement par inversion, avant que le mélange ne soit centrifugé pendant 2 min à 12 000 *rpm*. Le surnageant est éliminé et le culot est lavé avec 300 µL d'éthanol à 70 % par centrifugation pendant une minute à 12 000 rpm. Le culot, représentant l'ADN obtenu, est séché à température ambiante pendant une nuit puis re-suspendu dans 40 µL d'eau bidistillée stérile afin d'être conservé à -20 °C pour une utilisation ultérieure.

La quantification de l'ADN extrait sert à déterminer la quantité d'ADN présente dans les échantillons, mais aussi de vérifier sa qualité (pureté). Chaque échantillon est dilué (1/200e)

dans de l'eau bidistillée stérile. La mesure de la densité optique (DO) se fait à l'aide d'un spectrophotomètre UV-visible à deux longueurs d'onde différentes :

- 260 nm : longueur d'onde d'absorption des acides nucléiques : ADN et ARN
- 280 nm : longueur d'onde d'absorption des protéines.

Le rapport des DO : $DO_{260\ nm}$ /$DO_{280\ nm}$ nous permet de connaître la pureté de l'ADN. Il doit être compris entre 1,8 et 2,0. S'il est inférieur à 1,8, il y a contamination par des protéines et s'il est supérieur à 2,0, il s'agit d'une contamination par des ARN. La quantité d'ADN est calculée selon la formule suivante :

- [ADN] = DO_{260} nm x 50 x facteur de dilution (µg/ml). Remarque : 1 unité $DO_{260\ nm}$ = 50 µg/ml d'ADN.

2. Amplification par PCR et électrophorèse en gel d'agarose

Le gène codant pour l'ARNr 16S est amplifié par PCR avec un Kit MP Biomédical.

Les amorces utilisées sont : 27f (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') et 1492r (5' GGTTACCTTGTTACGACTT 3'). Le mélange réactionnel contient, pour un volume final de

50 L :

- 25 à 50 ng d'ADN génomique.
- 0,5 µM de chaque amorce 27f et 1492r.
- tampon PCR 1X composé de : 10 mM tris-HCl ; 50 mM KCl ; 1,5 mM MgCl2 0,1% Triton X-100 ; 0,2 mg/mL de Bovine Serum Albumin (BSA) ; pH 9,0 ; à 25 °C.
- 200 µM du mélange désoxynucléoside triphosphate (dNTPs) et 1,5 U de *Taq* ADN polymérase.

L'amplification a été effectuée dans un thermocycleur BIORAD My CyclerTM selon le profil suivant : une étape initiale de dénaturation à 98 °C pendant 4 min, suivie d'une pause permettant l'addition de la *Taq* polymérase. Par la suite, 30 cycles d'amplification ont été effectués (dénaturation à 94 °C pendant 1 min, hybridation à 52 °C pendant 1 min et extension à 72 °C pendant 2 min).

A la fin des cycles, le mélange réactionnel est maintenu à 72 °C pendant 10 min pour l'élongation finale, puis refroidi à 4 °C. Les produits de la PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose (à 0,8 %), où les fragments d'ADN sont séparés, leur taille, déterminée et leur qualité, vérifiée. Le gel d'agarose a été préparé après solubilisation de 480 mg d'agarose en poudre (DNA grade, Euromedex) dans 60 mL de tampon TAE 1X (Tris acétate EDTA ; Euromedex). Le mélange a été porté à ébullition pendant 2 min dans une micro-onde pour faire fondre l'agarose. Le gel est coulé sur la plaque d'électrophorèse horizontale (10 × 4

× 1 cm). Des puits, dans lesquels les échantillons seront déposés, ont été formés par positionnement d'un peigne. La solidification du gel a lieu après 30 min à température ambiante.

Le peigne est ensuite retiré. Six microlitres de chaque amplifiat obtenu par PCR sont alourdis par 1 µL de tampon de charge contenant du bleu de bromophénol, puis déposés dans un des puits du gel déjà immergé dans le tampon TAE 1X. La migration a lieu à 100 volts pendant 35 min. Un marqueur de taille de 1 Kb DNA Ladder est déposé dans un des puits pour vérifier la taille des amplifiats.

Après migration des échantillons, le gel est placé dans un bain de bromure d'éthydium (BET) et de TAE 1X pour révéler les bandes d'ADN. Étant un agent mutagène, le BET s'intercale entre les acides nucléiques et fluoresce sous lumière UV à 254 nm. Après révélation, le gel est déposé sur un transilluminateur (table UV) d'un appareil gel Doc XR pour visualiser les bandes d'ADN et vérifier leur taille.

3. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S

La détermination des séquences a été effectuée par un séquenceur automatique, et avec les mêmes amorces utilisées lors de la PCR. Une fois obtenues, et à l'aide du serveur EzTaxon-e **(http://eztaxon-e.ezbiocloud.net)**, la position phylogénétique des souches a été déterminée après comparaison, par le test du BLAST, des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S obtenues avec celles des espèces de référence répertoriées dans cette banque de données génomiques **(Kim *et al.*, 2012).**

ANNEXE N°3

Milieux de production des antibiotiques

1. Le milieu ISP2 : la composition de milieu ISP2 est similaire à celle utilisée lors de l'identification des actinobactéries.

2. Milieu synthétique (MS) : avec une source de carbone a raison de 10g de (dextrine, amidon, glycose, glycérol, saccharose) ; 2g de NaCl ; 1g de K2HPO4 ; 0.5g de KH2PO4 ; 0,2g de MgSO4, 7H2O ; 2g de CaCO3 ; 2g de (NH4)2SO4 **(Bouras et *al.*, 2006).**

3. Milieu semi synthétique (MSS) : avec une source de carbone a raison de 10g de (dextrine, amidon, glycose, glycérol, saccharose) ; 3g d'extrait de levure ; 2g de NaCl ; 1g de K2HPO4 ; 0.5g de KH2PO4 ; 0,2g de MgSO4, 7H2O ; 2g de CaCO3 ; 2g de (NH4)2SO4 **(Bouras et *al.*, 2006).**

ANNEXE N° 4

MICROORGANISMES-CIBLES

- Les germes cibles utilisés pour évaluer les propriétés antagonistes, et pour tester l'activité antimicrobienne de la souche AHO23.

Espèces			Résistance	Sensibilité
Bactéries	**Gram positive**	*Staphylococcus aureus* (MRSA 639c) *Staphylococcus aureus S(Sa.s)*	K, OXA, PEN, TE, MET	RIF, VAN
		Listeria monocytogenes (ATCC 13932)	OXA, FOS, CIP, CAZ, CTX, CXC, FEP, FOX, LIN, CLD, PRL	RIF,PEN, COT,GLY, FLU
		Bacillus subtilis(ATCC 663)	NEO	C, CAR, CHL, ERY, GEN, K, RIF, SPI, SSS, VAN
	Gram négative	*Salmonella typhi(ST)*	AM, SSS, SXT, TE, TMP, AMX	CIP,NOR, CAZ,AN, CRO, CXM
		Escherichia coli (ATCC 8739)	AMC, AMX,CF, CAZ,CTX,CXM, FOX, TCC, TIC	C, CXC
		Pseudomonas aeruginosa (ATCC 9027)	CAR, ERY, GEN, NEO, SPI, SSS	C, CHL, K, RIF
		Agrobacterium(Agro)	KM, HM	-
		Acinetobacter baumannii (S54)	CAZ, CIP, IPM	CS, AN
Champignons		*Aspergillus carbonarius(AC)*	CHX, NYS	AMB, ITR, TER, TIZ
		Aspergillus ochraceus(AO)	-	-
		Aspergillus fumigatus(AF)	VOR, POS, AM	-
		Aspergillus westerdijkiae (ATCC 3174)	-	-
		Fusarium culmurum(FC)	CHX, ITR, NYS, TIZ	AMB, TER
		Fusarium poae(Fp)	-	-
		Umbelopsis ramanniana (NRRL 1829)	CHX, ITR, TER, TIZ	AMB, NYS
		Penicillium exapansum(Pe)	-	-
		Penicillium glabrum(Pg)	-	-
Levure		*Candidas albicans(M3)*	CHX, ITR, NYS, TER, TIZ	AMB

ANNEXE N°5

Activité antibactérienne de la souche AHO23

1. photo de l'activité antagoniste de la souche AHO23

L'activité antagoniste de la souche AHO23 contre les germes ciblent sur le milieu ISP2 semi-solide, par la méthode des cylindres d'agar.

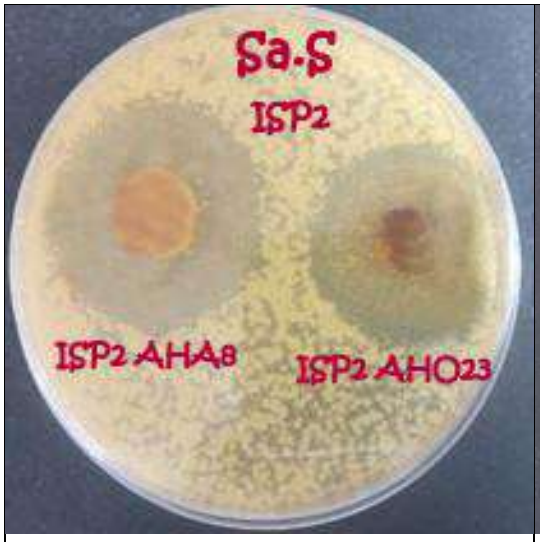

figure 24 : Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *Sa.S.*

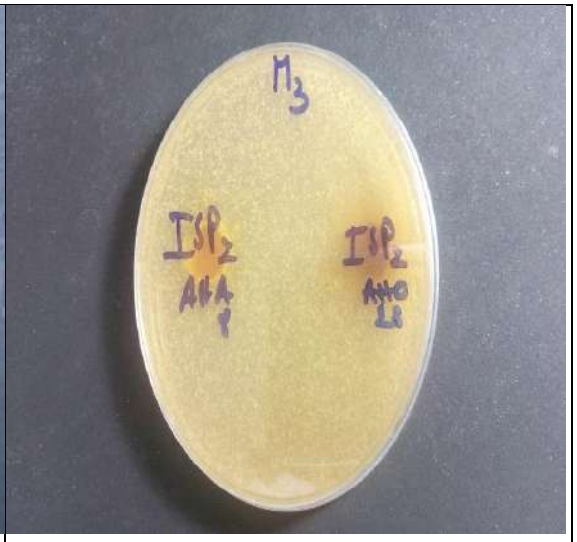

figure 25 : Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *M3*.

figure 26 : Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *BS*.

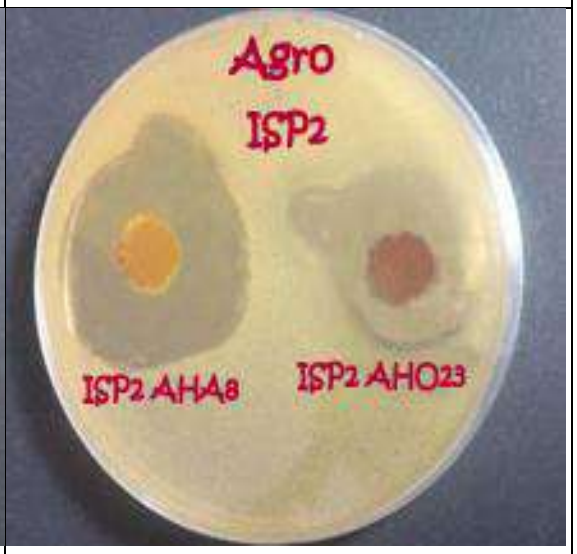

figure 27 : Activité antagoniste de la souche AHO23 contre *Agro*.

2. photo résultat dès l'activité antibactérienne au cours de la cinétique de la souche AHO23 dans un milieu liquide par la méthode de puis

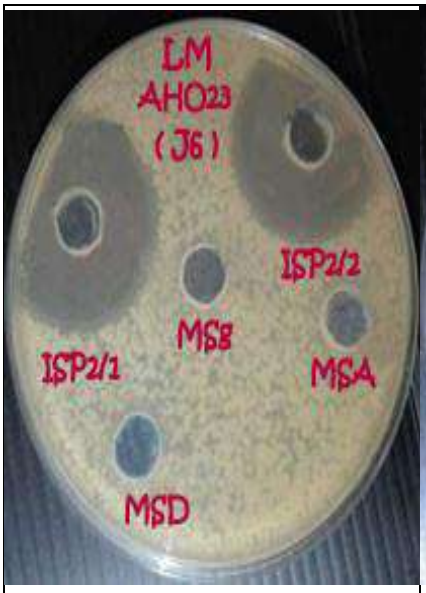

figure 28 : Activité antibactérienne de la souche AHO23 contre *LM*.

figure 29 : Activité antibactérienne de la souche AHO23 contre *E.coli*.

figure 30 : Activité antibactérienne de la souche AHO23 contre *Sa 639*.

Production et extraction d'antibiotiques à partir d'une souche d'actinobacteries (*Saccharothrix sp.* AHO23).

Résumé : Ce présent travail porte sur l'étude de la production, l'extraction et la purification des antibiotiques par la souche AHO23, isolée des sols sahariens de la région de Tamanrasset (Ahaggar station d'olivier). L'étude taxonomique a été réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques, physiologiques et phylogénétiques. Les résultats de cette étude ont permis d'affilier la souche AHO23 au genre *Saccharothrix* comme étant une nouvelle espèce de ce genre. Les potentialités antagonistes de la souche étudiée ont été évaluées par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis des microorganismes-cibles. Des activités importantes antibactériennes et antifongiques ont été produites contre tous les germes cibles testés (champignons filamenteux, bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif, et une levure), ces activités étant nettement plus fortes sur les milieux ISP2 et MSD. Les cinétiques de croissance et de production des composés bioactifs ont montré que l'activité antimicrobienne atteint son maximum le 5 ème jour sur le milieu MSD et le 6 ème jour sur le milieu ISP2. Les antibiotiques produits ont été extraits par le dichlorométhane qui a été déterminé comme étant le meilleur solvant d'extraction suite à l'antibiographie. La purification par HPLC de l'extrait de la souche AHO23 a montré la présence de quatorze composés bioactives en milieu ISP2, ce qui rend cette souche très intéressante dans la recherche médicale.

Mots clés

Sols sahariens, *Saccharothrix* sp., étude taxonomique, activité antagoniste, antibiotiques, extraction.

Production and extraction of antibiotics from a strain of actinobacteria (*Saccharothrix sp.* AHO23).

Abstract: This work focuses on the study of the production, extraction and purification of antibiotics by the strain AHO23, isolated from the Saharan soils of the Tamanrasset region (Ahaggar station d'olivier). The taxonomic study was carried out on the basis of morphological, physiological and phylogenetic characteristics. The results of this study allowed the AHO23 strain to be affiliated with the genus *Saccharothrix* as a new species of this genus.

The antagonistic potential of the strain studied was evaluated by the agar cylinder method in relation to the target microorganisms. Significant antibacterial and antifungal activities were produced against all target germs tested (filamentous fungi, gram-positive bacteria, gram-negative bacteria, and yeast), these activities being significantly stronger on ISP2 and MS-dextrin medium. The growth and production kinetics of the bioactive compounds showed that antimicrobial activity reaches its maximum on the 5th day on the MSD medium and the 6th day on the ISP2 medium. The antibiotics produced were extracted by dichloromethane, which was determined to be the best extraction solvent following antibiography. HPLC purification of AHO23 strain extract showed the presence of 14 bioactive compounds in ISP2 medium, which makes this strain very interesting in medical research.

Keywords

Saharan soils, *Saccharothrix sp.*, taxonomic study, antagonistic activity, antibiotic production, extraction.

إنتاج واستخراج المضادات الحيوية من سلالة أكتينوبكتيريا (*Saccharothrix sp.* AHO23).

ملخص: يتناول هذا البحث إنتاج المضادات الحيوية واستخراجها وتنقيتها من خلال سلالة أكتينوبكتيريا AHO23، المعزولة من التربة الصحراوية في منطقة تمنراست (Ahaggar station d'olivier). أجريت الدراسة التصنيفية على أساس الخصائص المورفولوجية والفزيولوجية والوراثية وقد سمحت نتائج هذه الدراسة للسلالة AHO23 بالانتساب إلى جنس *Saccharothrix* كنوع جديد. تم تقييم القدرة التضادية للسلالة التي تمت دراستها من خلال طريقة أسطوانة الأغار بالنسبة للكائنات الدقيقة المستهدفة. وقد تم إنتاج أنشطة مهمة مضادة للبكتيريا والفطريات ضد جميع الجراثيم المستهدفة المختبرة (الفطريات، والبكتيريا موجبة الغرام، والبكتيريا سالبة الغرام، والخميرة)، وهذه الأنشطة أقوى بكثير في الوسطين ISP2 و MS-dextrine.أظهرت حركيات النمو والإنتاج للمركبات الحيوية النشطة أن نشاط مضادات الميكروبات يصل إلى أقصى حد له في اليوم الخامس في وسط MSD واليوم السادس في وسط ISP2. المضادات الحيوية المنتجة استخرجت بواسطة ثنائي كلوروميثان والذي تم تحديده كأفضل مذيب الاستخراج بعد الكشف التضادي. كما أظهرت عملية تنقية HPLC من مستخلص AHO23 وجود 14 مركباً حيوياً في وسط ISP2, مما يجعل هذه السلالة مثيرة للاهتمام للغاية في البحث الطبي.

الكلمات المفتاحية

تربة صحراوية، *Saccharothrix sp*، دراسة تصنيفية، انتاج مضادات حيوية النشاطات التضادية، استخلاص.