

UNIVERSITE KASDI MERBAH OUARGLA

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département des Sciences Biologiques



Mémoire En vue de l'obtention du diplôme de

MASTER ACADEMIQUE

Domaine : Sciences de la nature et de la vie.

Filière : Sciences Biologiques.

Spécialité : Microbiologie appliquée.

Présenté par : KHERRAZ Assia

Thème

**Étude des propriétés antagonistes et antimicrobiennes
d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces sp.* AH08**

Soutenu publiquement

Le: 30/09/2020

Devant le jury :

Mme BELDI Nadia	M.C.B	Présidente	UKM Ouargla
M. SAADI Sid Ahmed	M.A.A	Encadreur	UKM Ouargla
M. BOURICHA M'hamed	M.A.A	Examineur	UKM Ouargla

Année Universitaire: 2019/2020

Remerciements

Tout d'abord, gloire soit rendue au Dieu « Allah » tout puissant créateur de toutes choses, le miséricordieux pour tous ses bienfaits dont il m'a comblé et m'avoir donné le courage et la force pour réaliser ce modeste travail.

Ce travail a été réalisé dans le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale supérieure. Kouba-Alger.

Je remercie infiniment mon encadreur, Monsieur SAADI Sid-Ahmed Maitre assistant classe A à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour m'avoir accordé la chance pour pouvoir réaliser ce mémoire, aussi son accueil au laboratoire LBSM auprès duquel j'étais vraiment honorée par sa diligence ainsi que son suivi rigoureux de très près tout au long de la partie expérimentale, pour son aide, sa disponibilité et pour avoir mis à ma disposition toutes les ressources nécessaires à la réalisation de ce thème. Je lui suis très reconnaissante.

Je tiens aussi à remercier très chaleureusement Madame BELDI Nadia, Maitre de conférences classe B à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, pour l'honneur qu'elle m'a fait en acceptant de présider ce jury.

J'exprime toute ma gratitude et mes remerciements au Monsieur BOURICHA M'hamed Maitre assistant classe A à l'Université Kasdi Merbah Ouargla, qui m'a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Mes remerciements les plus respectueux s'adressent au défunt Monieur SABAOU Nasserline, Professeur à l'ENS de Kouba, pour sa sympathie, son aide et ses conseils scientifiques qui ne font qu'améliorer ce travail. Que Dieu le tout Puissant lui accorde sa miséricorde et l'accueille dans son vaste Paradis.

Je présente mes remerciements les plus sincères à tous les membres du laboratoire LBSM, en particulier M. Zitouni Abdelghani, M. TOUMATIA Omrane sans oublier son étudiante Mlle TITOUAH Houda 'la princesse', Mme YAICHE ACHOUR Hafsa, Mme YOUSFI Khaira, pour leur aide que j'ai apprécié vivement, leurs conseils scientifiques et leur gentillesse.

Je ne saurais terminer sans souligner le soutien amical et chaleureux de mes amies et collègues YAGOUBI Ibtissam, BACHOUICHE Hamida, KASRI Bisma et SAHRAOUI Karima Je n'oublierai jamais leur aide et encouragement.

Enfin, j'exprime mes remerciements et ma reconnaissance à toute personne ayant contribué de près ou de loin pour la réalisation de ce travail.

Dédicaces

Avant tout, je remercie le Bon Dieu Clément et Miséricordieux pour tous ces dons et facilitations, que ce présent travail a vu le jour.

Je dédie affectueusement ce modeste travail :

*À mes très chers parents Saad et Nacera DACI qui m'ont soutenu tout au long de mes études par leur amour, leurs prières et leurs encouragements. Quelle que soit ma reconnaissance, elle reste bien faible au regard de ce que je leur dois. Puisse Dieu, le très haut, leur préserve leur santé, bonheur et longue vie.
J'espère que je suis la bonne fille dont vous avez rêvée.*

À mes très chers et adorables frères et sœurs, Abdallah, Abderraouf, Meriem et la plus belle Douaa pour leurs encouragements permanents, leur soutien moral et leurs bonnes humeurs. Que Dieu vous garde pour moi, vous protège et j'espère que leur chemin soit plein de succès.

À toute la famille KHERRAZ et DACI.

À mes connaissances et à tous ceux qui sont chers à mon cœur.

À mes chères amies de la promotion du master Microbiologie appliquée, en témoignage de l'amitié qui nous a unit et les souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous souhaite une vie pleine de santé et de bonheur. À tous les étudiants, enseignants et personnels du département des Sciences Biologiques.

Egalement aux professeurs qui m'ont suivi durant mes années d'études, du primaire jusqu'à l'université cela étant en témoignage aux efforts qu'ils ont consentis en ma faveur, j'éprouve ma sympathie dans ce mémoire.

À tous ceux qui, par un mot, m'ont donné la force de continuer, à tous ceux que j'ai omis de citer.

Merci d'être une part de ma vie

Assia

Table des matières

Remerciements

Dédicaces

Index des figures

Index des tableaux

Liste des abréviations

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction 1

Partie I. Synthèse bibliographique

Chapitre I. Le genre *Streptomyces*

I.1. Définition et caractéristiques principales	3
I.2. Cycle de développement.....	5
I.3. Génétique	7
I.4. Écologie	7
I.5. Taxonomie	8
I.5.1. Caractérisation morphologique.....	8
I.5.2. Taxonomie numérique	9
I.5.3. Chimiotaxonomie et la caractérisation moléculaire.....	11
I.6. Bioactivité.....	12
I.7. Importance des <i>Streptomyces</i>	13

Chapitre II. Production d'antibiotiques par les *Streptomyces*

II.1. Généralités	14
II.2. Antibiotiques produits par les <i>Streptomyces</i>	15
II.2.1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne	15
II.2.1.1. β -lactamines	15
II.2.1.2. Glycopeptides.....	16
II.2.1.3. Fosfomycine	16
II.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines	17
II.2.2.1. Macrolides et apparentés (MLS)	17
II.2.2.2. Aminoglycosides	18
II.2.2.3. Tétracyclines	18
II.2.2.4. Phénicolés	19

II.2.3. Antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques	19
II.2.4. Antibiotiques antifongiques.....	19
II.3. Facteurs influençant la production des antibiotiques	20
II.3.1. Milieu de culture de production	20
II.3.2. Inoculum	20
II.3.3. Influence des sources nutritionnelles.....	21
II.3.4. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation	21

Partie II. La partie expérimentale

Chapitre III. Matériels et méthodes

III.1. Lieu de stage	22
III.2. Matériels	22
III.2.1. Provenance de la souche AH08 de <i>Streptomyces</i>	22
III.2.2. Germes cibles	22
III.2.3. Milieux de culture.....	23
III.2.4. Appareillage	23
III.3. Méthodes	23
III.3.1. Étude morphologique.....	23
III.3.2. Étude physiologique.....	24
III.3.2.1. Utilisation des composés glucidiques.....	24
III.3.2.2. Utilisation de divers autres composés organiques	24
III.3.2.3. Production de nitrate réductase	24
III.3.2.4. Production de pigments mélanoides	25
III.3.3. Identification moléculaire	25
III.3.3.1. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et phylogénie de la souche AH08	25
III.3.3.2. Analyses phylogénétiques.....	25
III.3.4. Pré-culture et cultures de production des activités antimicrobiennes	26
III.3.4.1. Milieux de culture de production	26
III.3.4.2. Inoculum	26
III.3.4.3. Pré-culture.....	26
III.3.4.4. Culture pour les cinétiques de production	26
III.3.5. Activité antagoniste de la souche AH08 (milieu synthétiques et semi synthétiques)	27

III.3.6. Mesure de l'activité antibactérienne et antifongique, de la croissance et du pH	28
III.3.6.1. Mesure de l'activité antibactérienne.....	28
III.3.6.2. Mesure de l'activité antifongique.....	28
III.3.6.3. Mesure du pH.....	29
III.3.6.4. Mesure de croissance (Biomasse)	29
III.3.7. Extraction des substances antimicrobiennes à partir des milieux de production	29
III.3.7.1. Extraction d'antibiotique par des solvants.....	29
III.3.7.2. Antibiotographie.....	30

Chapitre IV. Résultats et discussion

IV.1. Caractérisation de la souche <i>Streptomyces</i> AH08.....	31
IV.1.1. Caractéristiques phénotypiques	31
IV.1.2. Caractéristiques physiologiques	32
IV.1.3. Identification moléculaire.....	33
IV.2. Activité antagoniste de la souche AH08 (milieux synthétiques et semi synthétiques).....	35
IV.2.1. Résultats	35
IV.2.2. Discussion.....	37
IV.3. Cinétique de la croissance, du pH et de l'activité antibactérienne et antifongique de la souche <i>Streptomyces</i> AH08	38
IV.3.1. Résultats	38
IV.3.1.1. Cinétique de croissance et du pH.....	38
IV.3.1.2. Cinétique de l'activité antimicrobienne	38
IV.3.2. Discussion.....	40
IV.3.2.1. Cinétique de croissance	40
IV.3.2.2. Cinétique du pH	41
IV.3.2.3. Cinétique de l'activité antimicrobienne	42
IV.4. Antibiotographie.....	43
IV.4.1. Résultats	43
IV.4.2. Discussion.....	44
Conclusion et perspectives	46
Références bibliographiques.....	48
ANNEXES	

Index des figures

Figure 1. Morphologie de chaines de spores rencontrées chez les espèces <i>Streptomyces</i> (Hamedi et Poorinmohammad, 2017).....	4
Figure 2. Diagramme d'une section verticale à travers le centre de sporulation de <i>Streptomyces coelicolor</i> , en noir les cellules intactes et en blanc les cellules désintégrées (Dworkin <i>et al.</i> , 2006)	5
Figure 3. Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> (Hopwood <i>et al.</i> , 1985).	6
Figure 4. Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah <i>et al.</i> , 2000). ..	6
Figure 5. Dendrogramme simplifié représentant les principales classes taxonomiques du genre <i>Streptomyces</i> selon la classification numérique de Williams <i>et al.</i> (1983) (Anderson et Wellington, 2001).....	10
Figure 6. Structure chimique d'un glycopeptide (La vancomycine) (Sköld, 2011).....	16
Figure 7. Structure chimique de la fosfomycine (Hashemian <i>et al.</i> , 2019).	17
Figure 8. Structure d'un macrolide (Erythromycine) (Sköld, 2011).	17
Figure 9. Structure d'un aminoglycoside (La streptomycine) (Hamedi <i>et al.</i> , 2017b).....	18
Figure 10. Structure d'un tétracycline (l'oxytétracycline) (Hamedi <i>et al.</i> , 2017b).....	18
Figure 11. Structure du chloramphénicol (Hamza <i>et al.</i> , 2018).	19
Figure 12. Schéma simplifié du protocole de la cinétique de production des antibiotiques. ..	27
Figure 13. Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche AH08 par la méthode des cylindres d'agar.	27
Figure 14. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche AH08 par la méthode de diffusion de puits d'Aszalos (1986).....	29
Figure 15. Macro-morphologie (A) et micro-morphologie (B) avec microscopie optique des chaînes de spores de la souche AH08 cultivée sur ISP2 pendant 14 jours à 30 °C, bar 100µm.	32

Figure 16. Arbre phylogénique basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S montrant les relations entre la souche AH08 et toutes les espèces de souches de <i>Streptomyces</i>	34
Figure 17. Activité antagoniste de la souche <i>Streptomyces</i> AH08 contre <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA639c) (Sa 639) et <i>Listeria monocytogenes</i> (Lm) sur le milieu ISP2.	36
Figure 18. Cinétique du pH, du poids sec et de l'activité antibactérienne contre <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (MRSA639c) (■), <i>Escherichia coli</i> (ATCC8739) (▲) et <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC13932) (●) et de l'activité antifongique contre <i>Aspergillus carbonarius</i> (Ac) (●), <i>Aspergillus ochraceus</i> (Ao) (■), <i>Fusarium culmorum</i> (Fc) (▲) et <i>Umbelopsis ramanniana</i> (Ur) (×) dans le milieu MSA. .	39
Figure 19. Activité antibactérienne de la souche <i>Streptomyces sp.</i> AH08 contre <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC13932) (LM) et <i>Escherichia coli</i> (ATCC8739) par la méthode de diffusion de puits.	40
Figure 20. Activités antibactériennes des extraits de dichlorométhane (D), n-hexane (H), acétate d'éthyle (E.A) et n-butanol (B) contre <i>Escherichia coli</i> (ATCC 8739) et <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 13932) par la méthode du disque papier.	44
Figure 21. Photographie d'un shaker de la marque «New Brunswick Scientific».	Annexe 1
Figure 22. Photographie d'une micro-centrifugeuse des éppendorfs sigma 1-14.	Annexe 1
Figure 23. Photographie d'une centrifugeuse de la marque JUAN E96.	Annexe 1
Figure 24. Photographie d'une balance.	Annexe 1
Figure 25. Photographie d'un pH mètre (Hanna Instruments PH211).	Annexe 1
Figure 26. Photographie d'une étuve de la marque etuvesmemmert.	Annexe 1
Figure 27. Photographie d'un autoclave de la marque pbi 96 de 65 litre.	Annexe 1
Figure 28. Photographie d'un rotavapeur de la marque BUCHI Rotavapor R210.	Annexe 1

Index des tableaux

Tableau 1. Les tests phénotypiques et génotypiques supplémentaires utilisées dans les méthodes chimiotaxonomiques et moléculaires selon (Bergey's Manual, 2012).	11
Tableau 2. Exemples de quelques molécules produites par le genre <i>Streptomyces</i> (Solanki et al., 2008).	12
Tableau 3. Exemples des antibiotiques produits par les <i>Streptomyces</i> (Hughes et Andersson, 2001).	15
Tableau 4. Caractéristiques macro-morphologiques de la souche AH08 sur différents milieux après 14 jours d'incubation	32
Tableau 5. Caractéristiques physiologiques de la souche AH08 en comparaison avec l'espèce la plus proche <i>Streptomyces djakartensis</i> NBRC15409 ^T (AB184657).	33
Tableau 6. Activité antagoniste de la souche AH08 par la méthode de cylindres d'agar sur le milieu ISP2.	36
Tableau 7. Activité antimicrobienne de <i>Streptomyces sp.</i> AH08 contre <i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA639c), <i>Escherichia coli</i> (ATCC8739) et <i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC13932) en utilisant différents solvants organiques.	44

Liste des abréviations

ARNr 16S: Acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S.

Ac: *Aspergillus carbonarius*.

Ao: *Aspergillus ochraceus*.

ATCC: American Type Culture Collection.

C.H.V: chitine-vitamines B agar.

DO: Densitéoptique.

Fc: *Fusarium culmorum*.

F: Fraction.

G+C: Guanine + Cytosine.

ISP2 : International *Streptomyces* Project 2 (milieu de culture).

Lm: *Listeria monocytogenes*

MH: Muller Hinton.

rpm: rotation par minute.

MRSA: Methicillin-resistant Staphylococcus.

MS: Milieu de culture synthétique.

MSA: Milieu de culture synthétique additionné de l'amidon.

MSL: Milieu de culture synthétique additionné du glycérol.

MSD : Milieu de culture synthétique additionné de la dextrine.

MSS : Milieu de culture semi-synthétique.

MSSA : Milieu de culture semi-synthétique additionné de l'amidon.

MSSL: Milieu de culture semi-synthétique additionné du glycérol.

MSSD: Milieu de culture semi-synthétique additionné de la dextrine.

PDA: potato dextrose agar.

pH: potentiel Hydrogène.

µl: microlitre

µm: micromètre.

S.: *Streptomyces*.

Sa: *Staphylococcus aureus*.

UV: Ultraviolet.

Ur: *Umbelopsis ramanniana*.

Résumé

Étude des propriétés antagonistes et antimicrobiennes d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces* sp. AH08

La présente étude s'intéresse d'une part à la taxonomie d'une souche d'actinobactéries AH08 et d'autre part à sa capacité de produire les antibiotiques en évaluant leur activité antimicrobienne et leurs propriétés antagonistes contre des germes pathogènes ainsi que l'extraction de ces antibiotiques sécrétés.

L'étude taxonomique réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires a permis de rattacher notre souche au genre *Streptomyces*, avec une similarité 99,57 % avec la souche *S. djakartensis* NBRC15409^T. La recherche des meilleures conditions nutritionnelles a été réalisée en suivant des cinétiques de production, de croissance, de pH et de l'activité antimicrobienne, dans des milieux de culture synthétiques (MS) et semi-synthétiques (MSS) additionnés de 3 sources de carbone : amidon, dextrine, glycérol. Les résultats de la cinétique révèlent que la production est maximale dans le milieu MS avec amidon (MSA) au 5^{ème} jour de fermentation, à un pH basique et durant les phases exponentielle et de déclin de croissance. Les tests de l'activité antimicrobienne et antagoniste ont révélé que la souche AH08 est douée d'une bonne activité antibactérienne, antifongique et antagoniste à large spectre d'action, la plus grande activité est notée contre *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) avec une zone d'inhibition de 45 mm dans le milieu MSA et le plus grand potentiel antagoniste est dirigé contre *Micrococcus luteus* avec une zone d'inhibition de 57 mm dans le milieu ISP2. L'extraction des antibiotiques par les solvants organiques a été suivie par un test d'antibiographie, les résultats ont montré que le dichlorométhane c'est le meilleur solvant.

Les résultats expérimentaux obtenus ouvrent des perspectives positives pour poursuivre le travail et pour des bonnes exploitations industrielles de la souche et ses antibiotiques.

Mots clés : Taxonomie, *Streptomyces* AH08, germes pathogènes, antagoniste, activité antimicrobienne, antibiotique.

Abstract

Study of the antagonistic and antimicrobial properties of a strain of actinobacteria
Streptomyces sp. AH08.

This study investigates the taxonomy of the strain of actinobacteria AH08, as well as its capacity to produce antibiotics by evaluating their antimicrobial activity and their antagonistic properties against pathogenic germs and also the extraction of these secreted antibiotics.

The taxonomical study was performed on the basis of morphological, chemical, physiological and molecular characteristics which allows to attach the strain AH08 to the genus *Streptomyces* with 99, 57% of similarity with the strain *S. djakartensis* NBRC15409^T. The search for the best nutritional conditions was carried out by following the kinetics of production, growth, pH and antimicrobial activity, in synthetic (MS) and semi-synthetic (MSS) culture media with the addition of 3 carbon sources: starch, dextrin, glycerol. The results of the kinetics show that the maximum production is obtained in the medium MS added with starch at day 5 of fermentation, at a basic pH and during the exponential and growth decline phases. The tests of antimicrobial activity and antagonist revealed that the strain AH08 is endowed with an antibacterial, antifungal activities and an antagoniste potential with broad-spectrum, the greatest activity is noted against *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) with an inhibition zone of 45 mm in the MSA medium and the greatest antagonist potential is directed against *Micrococcus luteus* with an inhibition zone of 57 mm in the ISP2 medium. Solvants extraction of antibiotics was followed by an antibiography test, the results showed that dichloromethane is the best solvent.

The experimental results obtained open up positive prospects for continuing the work and for good industrial exploitation of the strain and its antibiotics.

Keywords: Taxonomy, *Streptomyces* AH08, pathogenic germs, antagonist, antimicrobial activity, antibiotic.

ملخص

دراسة الخصائص التضادية و النشاط ضد الميكروبات لسلالة الاكتينوبكتيريا *Streptomyce sp.* AH08

تهتم هذه الدراسة بتصنيف سلالة الأكتينوبكتيريا AH08 بالإضافة لدراسة قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية من خلال تقييم نشاطاتها المضادة للميكروبات وخواصها التضادية؛ وذلك باستهداف جراثيم مسببة للأمراض فضلا عن استخراج هذه المضادات الحيوية التي تفرزها.

اعتمدنا في الدراسة التصنيفية على الخصائص المظهرية، الكيميائية، الفيزيولوجية والجزئية التي قربت السلالة AH08 للجنس *Streptomyce* بنسبة تشابه تصل حتى 99,57 % مع السلالة *S. djakartensis* NBRC15409^T. قمنا بالبحث عن المصادر الغذائية المثلى لإنتاج المضادات الحيوية عن طريق متابعة حركية الإنتاج، درجة حموضة الوسط ونشاطها المضاد للميكروبات في الأوساط MS و MSS مضاف لها 3 مصادر للكربون : النشاء، الدكسترين والغليسيرول. حيث أظهرت النتائج أن الإنتاج يكون في قيمته المثلى في الوسط MS المضاف له النشاء في اليوم الخامس من التخمر، في درجة حموضة قاعدية وأثناء طور النمو الأسّي وطور التحلل. أظهرت الاختبارات الخاصة بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا والخصائص التضادية أن السلالة AH08 تتمتع بنشاط جيد ضد البكتيريا والطفيليات وكذا قدرة تضادية ذوا طيف واسع. أكبر نشاط بكتيري سجل ضد *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) حيث بلغ قطر منطقة التثبيط 45 مم في الوسط MSA وأكبر قيمة للقدرة التضادية سجلت ضد *Micrococcus luteus* وبلغ قطر منطقة التثبيط 57 مم في الوسط ISP2. يتبع استخراج المضادات الحيوية باستعمال مذيبات عضوية بإختبار الكشف التضادي حيث أظهرت نتائج هذا الإختبار أن الديكلوروميثان هو المذيب الأمثل.

النتائج التجريبية التي تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة تفتح آفاقا إيجابية لمواصلة العمل والاستغلال الصناعي الجيد للسلالة ومضاداتها الحيوية.

الكلمات المفتاحية: تصنيف، *Streptomyces* AH08، جراثيم مسببة للأمراض، قدرة تضادية، نشاط مضاد

للميكروبات، مضاد حيوي.

Introduction

Introduction

Plusieurs bactéries, champignons et levures peuvent être l'origine des graves pathologies atteignant l'homme, comme par exemple: *Listeria*, *Salmonella*, *Microsporium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Candida* (**Aouiche et al., 2012**).

L'évolution des microorganismes pathogènes a fait apparaître le phénomène de la résistance de même que de mauvaises pratiques de prévention et de lutte contre l'infection (**Grace Yim, 2011**).

Plusieurs travaux ont signalés l'émergence des bactéries multi-résistantes à toutes les grandes classes d'antibiotiques et la diminution du nombre de candidats potentiels pour de nouveaux antibiotiques ce qui a pour effet d'aggraver les symptômes et d'augmenter les risques de mortalité associés aux infections. Donc, il serait urgent d'explorer de nouveaux composés antimicrobiens fiables et efficaces pour mieux prévenir la santé et lutter contre ce phénomène (**Namil et al., 2020**).

Les molécules bioactives disponibles à l'heure actuelle en thérapeutique ne réunissent pas les critères définissant l'antibiotique idéal: toxicité spécifique vis-à-vis de l'agent pathogène, bonne diffusion dans l'organisme, large spectre d'activité in vivo, absence de problèmes liés à l'apparition de souches résistantes et l'absence d'effets secondaires (**Aouiche et al., 2012**).

A ce propos, les actinobactéries sont les plus prolifiques de tous les microorganismes en tant que producteurs de métabolites bioactifs notamment les actinobactéries du genre *Streptomyces* qui sont les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Elles représentent 80 % du total produits par les actinobactéries, y compris non seulement des antibiotiques, mais aussi des agents antiviraux, antifongiques et antiparasitaires, ainsi que des composés antitumoraux et immuno-suppresseurs (**Smaoui, 2010; Solecka et al., 2012**).

En Algérie, plusieurs études sont réalisées sur les actinobactéries, toutes ces études portent sur l'isolement, l'identification et la taxonomie, la recherche de l'activité antimicrobienne, antagoniste et les études sur la production des antibiotiques. Ils ont aussi bien signalé la richesse des sols sahariens de l'Algérie par les actinobactéries (**Sabaou et al., 1998; Lamari et al., 2002a,b; Zitouni et al., 2004 a,b et 2005; Badji et al., 2005; Boudjella et al., 2006 et 2010; Merrouche et al., 2010; Aouiche et al., 2012; Meklat et al., 2012 et 2013; Boubetra et al., 2013; Toumatia et al., 2014,....**).

Les travaux de recherche de ce mémoire s'inscrivent dans le cadre de l'axe de recherche du laboratoire de recherche LBSM et sous le thème: L'étude des propriétés antagonistes et antimicrobiennes d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces sp.* AH08.

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs l'étude de caractéristiques morphologiques, physiologiques et moléculaires de la souche AH08, la cinétique de la production des antibiotiques, l'évaluation de l'activité antimicrobienne, antagoniste et l'antibiographie des extraits.

Le manuscrit est subdivisé en deux parties:

La première partie comporte une synthèse bibliographique, cette dernière est divisée en deux chapitres, le premier chapitre est réservé au genre *Streptomyces*.

Le deuxième chapitre concerne la production des antibiotiques par les *Streptomyces* dont on a montré les différents groupes des antibiotiques et les facteurs influençant leur production.

La deuxième partie comporte deux chapitres dont le premier décrit le matériel d'étude, les techniques et les méthodes utilisées et le deuxième présente les résultats obtenus et leur discussion.

Ces résultats et interprétations sont relatifs aux aspects suivants :

- Caractérisation et identification de la souche *Streptomyces* AH08.
- La cinétique de croissance, du pH et de l'activité antimicrobienne sur des milieux synthétiques et semi synthétiques en faisant varier les sources de carbone sur ces derniers milieux.
- Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche *Streptomyces* AH08.
- Test d'antibiographie des extraits par la méthode de disques papier.

Une conclusion finale et des perspectives ont aussi été énoncées à la fin de ce travail.

Partie I

Synthèse bibliographique

Chapitre I

Le genre Streptomyces

I.1. Définition et caractéristiques principales

Le genre *Streptomyces* a été proposé par Waksman et Henrici en 1943 et c'est le plus grand genre du monde bactérien, il appartient au groupe des Actinomycètes, sous-groupe des Streptomycètes en représentant le genre majoritaire avec un pourcentage de 95,34 %. (Anderson et Wellington, 2001; Saffroy, 2006; Wink *et al.*, 2017) environ 780 espèces de genre *Streptomyces* ont été décrits (Law *et al.*, 2017), le nom *Streptomyces* est du grec qui veut dire: Streptos: tordu ou courbé et myces: champignons (Williams *et al.*, 1989). Ils appartiennent à l'ordre des actinomycètes avec une structure filamenteuse qui a posé un problème dans leur classification où certains les considèrent comme des bactéries filamenteuses et d'autres comme des champignons, dans le temps actuel ce problème est totalement résolu et les actinomycètes sont classés parmi les bactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1981).

Ce sont donc des bactéries aérobies, Gram positive, filamenteuses, sporulantes, immobile avec un type de nutrition chimioorganotrophe et un métabolisme de type oxydatif, une catalase positive, aussi caractérisées par une teneur élevée en guanine plus cytosine (G+C) dans leurs génomes dont leur coefficient de Chargaff (G +C %) est compris entre 69 et 78% (Anderson et Wellington, 2001; Kämpfer, 2006; Bergey's Manual, 2012; Hasani *et al.*, 2014; Wink *et al.*, 2017; Toussaint, 2018). La plupart des espèces de *Streptomyces* sont sensibles au lysozyme (Mordarska *et al.*, 1978) . La gamme du pH optimal se situe entre 6.5 et 8 ainsi que quelques-unes d'entre eux sont acidophiles et croissent à des pH compris entre 3,5 et 6,5 elles ont donc une forte croissance dans les sols acides, de plus les valeurs optimales de la température de croissance sont de 25 à 35°C avec la présence de quelques espèces thermophiles et psychrophiles (Alexander, 1977; Kämpfer, 2006).

De point de vue morphologique ce genre se caractérise par 2 types de mycélium (figure 2) le premier est un mycélium de substrat (MS) non fragmenté, et le deuxième est un mycélium aérien (MA) qui produit des sporophores formant à leur tour des chaînes de spores (3 à 10, 10 à 50 ou plus de 50 spores par chaîne) pouvant être droites à flexueuses (type RF = Rectus Flexibilis), en crochets ou en boucles (type RA = Retinaculum Apertum) ou encore spiralées (type S = Spira). Les sporophores ne sont en général pas verticillés, sauf pour certaines espèces (Aouiche, 2013).

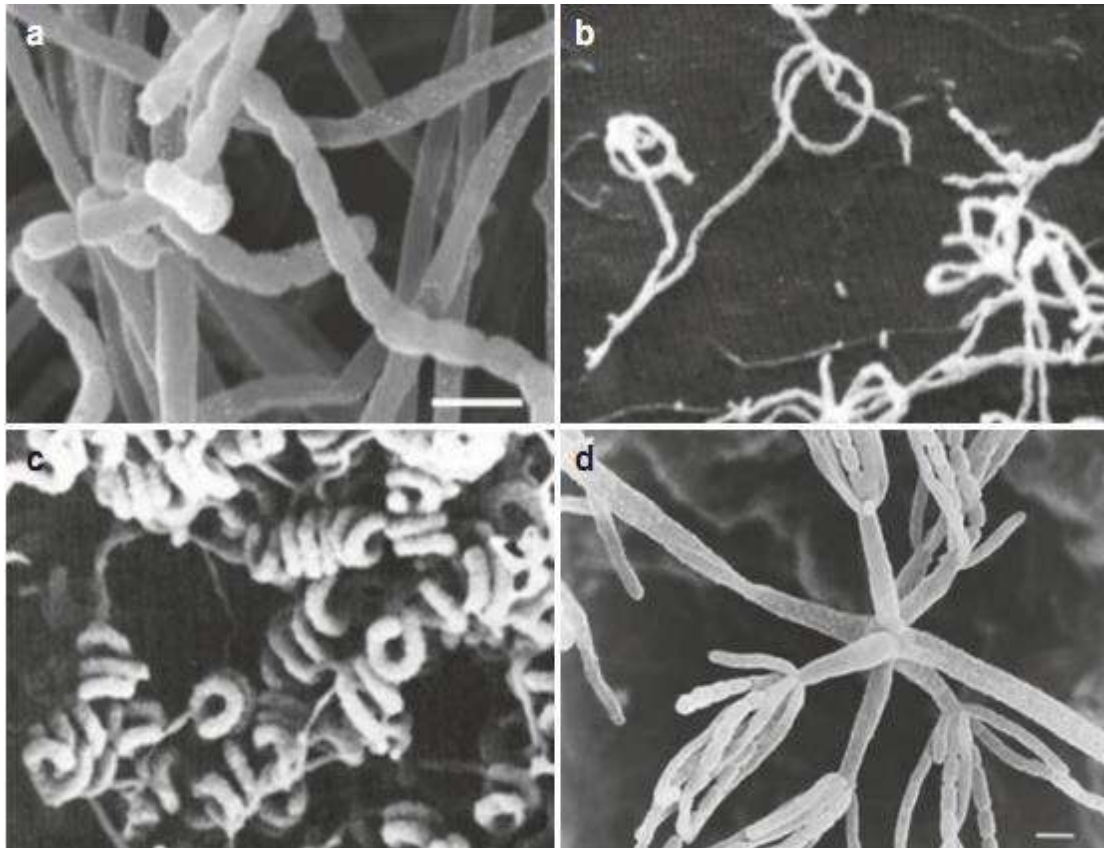


Figure 1. Morphologie de chaînes de spores rencontrées chez les espèces *Streptomyces* (Hamedi et Poorinmohammad, 2017).

(a) *Streptomyces plumbi-resistens*, (b) *Streptomyces vinaceus*, (c) *Streptomyces hygroscopicus* et (d) *Streptomyces verticillus*.

Alors que chimiquement, les *Streptomyces* possèdent une paroi de type IC, que signifie la présence de l'isomère LL de DAP (diaminopimelic acid) avec glycine et absence de sucres caractéristiques. Les phospholipides membranaires sont de type PII (Kämpfer, 2006; Smaoui *et al.*, 2011; Lechevalier *et al.*, 1977 in Aouiche, 2013).

L'importance de ce genre se réside dans sa capacité à produire une grande quantité de métabolites secondaires au cours de leur cycle de vie, il a été estimé que les actinobactéries sont responsables de la production de 45% des métabolites microbiennes connus dont 80% de ces antibiotiques sont sécrétés par des *Streptomyces* (Wink *et al.*, 2017; Toussaint, 2018; Tata *et al.*, 2019).

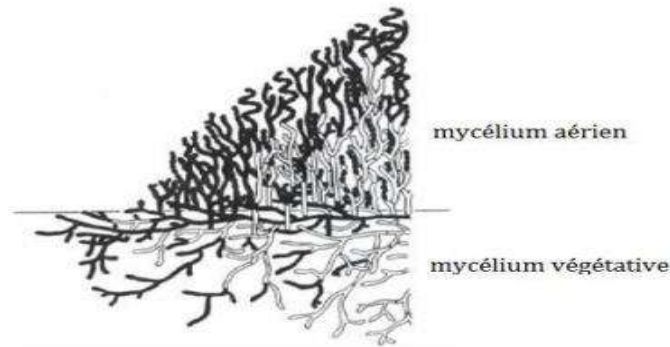


Figure 2. Diagramme d'une section verticale à travers le centre de sporulation de *Streptomyces coelicolor*, en noir les cellules intactes et en blanc les cellules désintégrées (Dworkin *et al.*, 2006).

I.2. Cycle de développement

Le cycle de vie le mieux étudié parmi les actinobactéries est celle de *Streptomyces* du fait de leur importance et sa capacité de produire divers métabolites secondaires.

En le situant dans des conditions optimales assurant ces besoins nutritionnels, les spores de *Streptomyces* se germent (La germination de spores comprend quatre étapes : l'activation, l'initiation, l'émergence du tube germinatif et sa croissance) et forment des hyphes ramifiées qui vont donner à leur tour la naissance à un mycélium végétatif ou autrement dit mycélium du substrat qui va envahir la partie inférieure du milieu, alors que dans des conditions de carence de nutriments, le mycélium végétatif va se différencier en mycélium aérien ou mycélium secondaire formé par un ensemble des hyphes non ramifiées à la surface du milieu au-dessus de ce dernier, de plus c'est la phase dans laquelle il y'aura la production de la plupart des antibiotiques et les métabolites secondaires.

Le cycle est continu par la différenciation des extrémités de mycélium aérien en chaînette de spores responsables de la résistance aux conditions défavorables et la dissémination de ces microorganismes immobiles. Quand les conditions favorables sont de nouveau réunies le cycle de développement se reprend (Manteca *et al.*, 2010; Barka *et al.*, 2016; Hamedi *et al.*, 2017a; Toussaint, 2018).

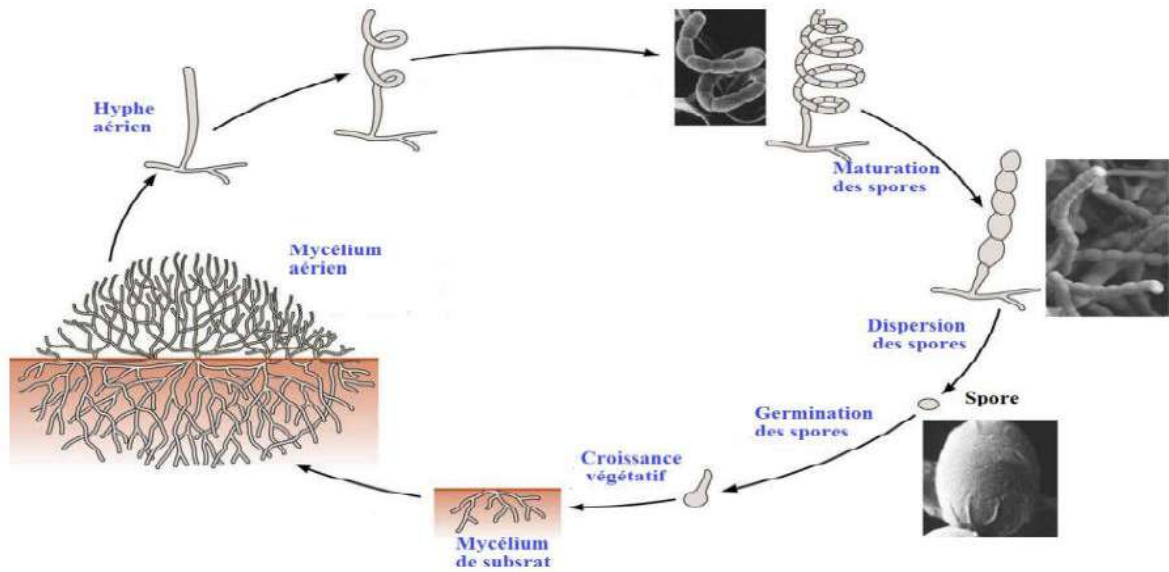


Figure 3. Cycle de développement du genre *Streptomyces* (Hopwood *et al.*, 1985).

La sporulation se manifeste aussi bien dans le milieu solide ainsi que dans le milieu liquide (Bergey's Manual, 2012).

Dans un milieu liquide le développement de ces bactéries aérobies nécessite une aération qui doit être assurée par une simple agitation (comme le cas de notre étude où on a utilisé un shaker pour agiter les milieux liquides) ou par l'ajout volontaire de l'air ou de l'oxygène (Saffroy, 2006). Ce développement peut se présenter sous 3 formes résultant de l'élongation des filaments (Figure 4).

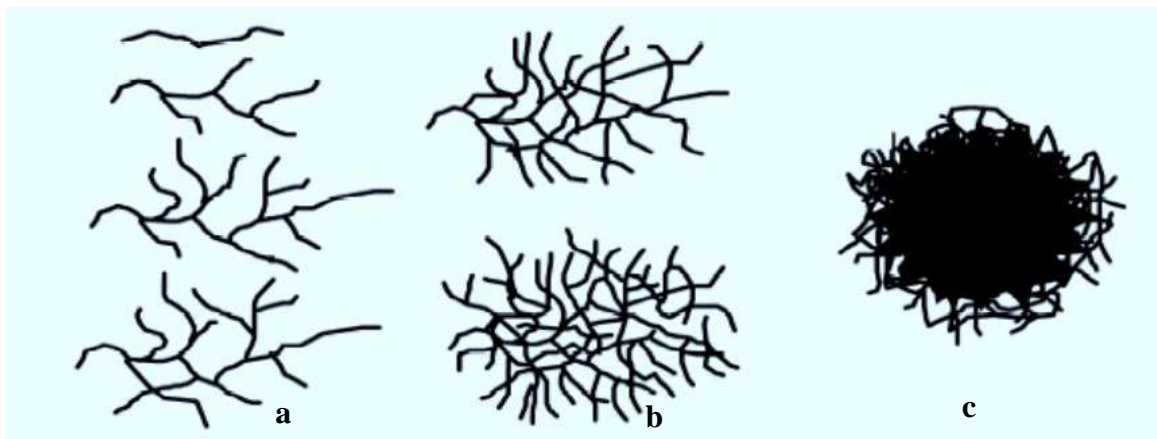


Figure 4. Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

- a- **Mycélium libre**: formé par des hyphes associées ou bien dispersées.
- b- **Enchevêtrement**: formé d'un ensemble des hyphes plus ramifiées et regroupées.
- c- **Pelote**: forme avancé de l'enchevêtrement (a une taille de 0.1 μ m à plusieurs millimètres).

L'inconvénient de cette dernière morphologie c'est la possibilité d'engendrer un blocage à l'entrer de l'oxygène et les nutriments aux bactéries qui se trouvent à l'intérieur de pelote (Saffroy, 2006).

I.3. Génétique

L'ADN chromosomique des *Streptomyces* est linéaire et contient plus de 8 millions paires de bases avec 7825 gènes assurant des fonctions essentielles telles que ceux de la division cellulaire, de la réplication de l'ADN, de la transcription, de la traduction et de la biosynthèse des acides aminés, et des fonctions non essentielles telle que la production des métabolites secondaires et des exoenzymes, ainsi que le génome est riche en guanine-cytosine (plus de 55%) (Bentley *et al.*, 2002; Tata *et al.*, 2019). L'adaptation rapide de ce genre dans la nature est le résultat de la grande plasticité de son génome (Bergey's Manual, 2012).

Le premier génome qui a été séquencé de genre *Streptomyces* et celle de *Streptomyces coelicolor* A3 (2) à la fin des années 1990 et représente le plus grand génome bactérien qui a été complètement séquencé. Le plasmide peut se présenter sous deux formes : circulaire ou linéaire avec certaines exceptions comme dans le cas de *Streptomyces hygroscopicus* 5008 son génome contient à la fois deux plasmides l'un linéaire (164.57 kb) et l'autre circulaire (73.28 kb), et le plus grand plasmide linéaire décrit est celui-ci nommé pSCL4 présent dans le génome de *Streptomyces clavuligerus* ATCC 27064 qu'est caractérisé par la production des métabolites secondaires de valeur dans le domaine de la biotechnologie (Bergey's Manual, 2012; Horbal et Luzhetskyy, 2017).

I.4. Écologie

Les *Streptomyces* sont des saprophytes ubiquistes qui peuvent se trouver dans tous les écosystèmes : les eaux douces, salées, l'air et principalement dans le sol à raison de 10^6 à 10^9 cellule/g représentant plus de 95% des actinomycètes de la terre (Takahashi et Nakashima, 2018). Ils jouent un rôle fondamental dans le sol en raison de leur large éventail de processus métaboliques et biotransformations. Il s'agit notamment de l'hydrolyse d'une large gamme de polysaccharides en particulier la cellulose, la chitine, le xylène, l'agar et d'autres macromolécules naturelles, ils participent aussi dans le recyclage du carbone organique, la structuration du sol en assurant sa rigidité et dans la protection de ces sols contre les facteurs naturels et les germes pathogènes de la rhizosphère en entrant en compétition avec eux (Bentley *et al.*, 2002; Hodgson, 2002; Hasani *et al.*, 2014; Barka *et al.*, 2016), néanmoins il

y'a certaines d'entre eux sont pathogènes pour l'homme et l'animal, alors qu'autres sont phytopathogènes (**Kämpfer, 2006**).

I.5. Taxonomie

Selon **Bergey's Manual l'édition 2012**, la classification s'établit comme suit :

- Règne des Procaryotae.
- Phylum des Actinobacteria.
- Classe des Actinobacteria.
- Ordre des Streptomycetales.
- Famille des Streptomycetaceae.
- Genre *Streptomyces*.

Vu que le *Streptomyces* est le genre le plus large dans le monde bactérien par rapport au nombre des espèces rencontrées qui pose un défi en ce qui a trait à sa caractérisation taxonomique. Les techniques utilisées ont évalué au cours des années, en commençant par la caractérisation morphologique, passant à des classifications basées sur des analyses taxonomiques numériques et plus récemment la taxonomie se base sur des études moléculaires phylogénétiques en utilisant des séquences de gènes (**Labeda et al., 2012**).

I.5.1. Caractérisation morphologique

En 1943 Waksman et Henrici (les premiers qui ont proposé le genre *Streptomyces*) ont le classé dans la famille des Streptomycetaceae sur la base des caractères morphologiques et le chimiotype de la paroi cellulaire (**Anderson et Wellington, 2001; Smaoui et al., 2011; Kämpfer et al., 2017**).

En 1964 Le projet international *Streptomyces* (ISP) a standardisé les critères de détermination des espèces (**Shirling et Gottlieb, 1968a, 1968b, 1969, 1972**).

Selon **Bergey's Manual 2012** les caractères morphologiques qui ont été étudiés sont principalement:

- L'arrangement de la chaîne des spores.
- L'ornementation de la surface des spores.
- La couleur des spores.
- Le mycélium du substrat.
- Les pigments solubles.
- La production de pigments de mélanine.

Et les propriétés physiologiques étudiées sont limitées aux tests d'utilisation de différents types de sources de carbone.

Ce qui a permis la reclassification de plus de 450 espèces de *Streptomyces*.

I.5.2. Taxonomie numérique

L'étude taxonomique réalisée par **William et al. (1983)** qui a été pour but d'analyser 475 souches dont 394 sont de genre *Streptomyces* en utilisant le coefficient de Jaccard (S_j), l'algorithme de liaison moyenne UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) et simple matching coefficient (S_{SM}), a permis de subdiviser le genre en groupes d'espèces et les souches testées ont été regroupées à la base des résultats de similarité obtenus à partir des tests phénétiques, plus spécifiquement elle a permis à l'établissement de 19 classes majeures (contenant 6-71 souches), 40 groupes mineurs (contenant 2-5 souches) et 18 classes à souche unique. La plus grande classe c'est *Streptomyces albidoflavus* (classe I) renferme 71 souches dont 44 sont des souches types, cette classe est ensuite divisée en trois sous classes: classe 1a, représentée par *Streptomyces albidoflavus* sous sp. *albidoflavus* (20 souches), classe 1b, représentée par *Streptomyces albidoflavus* sous sp. *anulatus* (38 souches), et classe 1c, représentée par *Streptomyces albidoflavus* sous sp. *halstedii* (13 souches) (**Williams et al., 1989; Kämpfer, 2006; Bergey's Manual 2012**).

Cette étude taxonomique de William et al. réduit le nombre des espèces décrit de 463 espèces dans l'édition de 1974 de Bergey's Manual, à 142 espèces dans l'édition de 1989 de Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Williams et al., 1989) (**Anderson et Wellington, 2001; Bergey's Manual 2012**).

La taxonomie numérique de **Williams et al. (1983)** a été mise à jour par **Langham et al. (1989)** et **Kämpfer et al. (1991)** en procédant à augmenter le nombre de tests ainsi que le nombre des souches dont beaucoup n'étaient pas inclus dans l'étude de Williams et ce pour améliorer la classification établie en intégrant des classes mineures ainsi que des classes majeures néanmoins la majorité des caractères de **Williams et al. (1983)** sont maintenus (**Anderson et Wellington, 2001**).

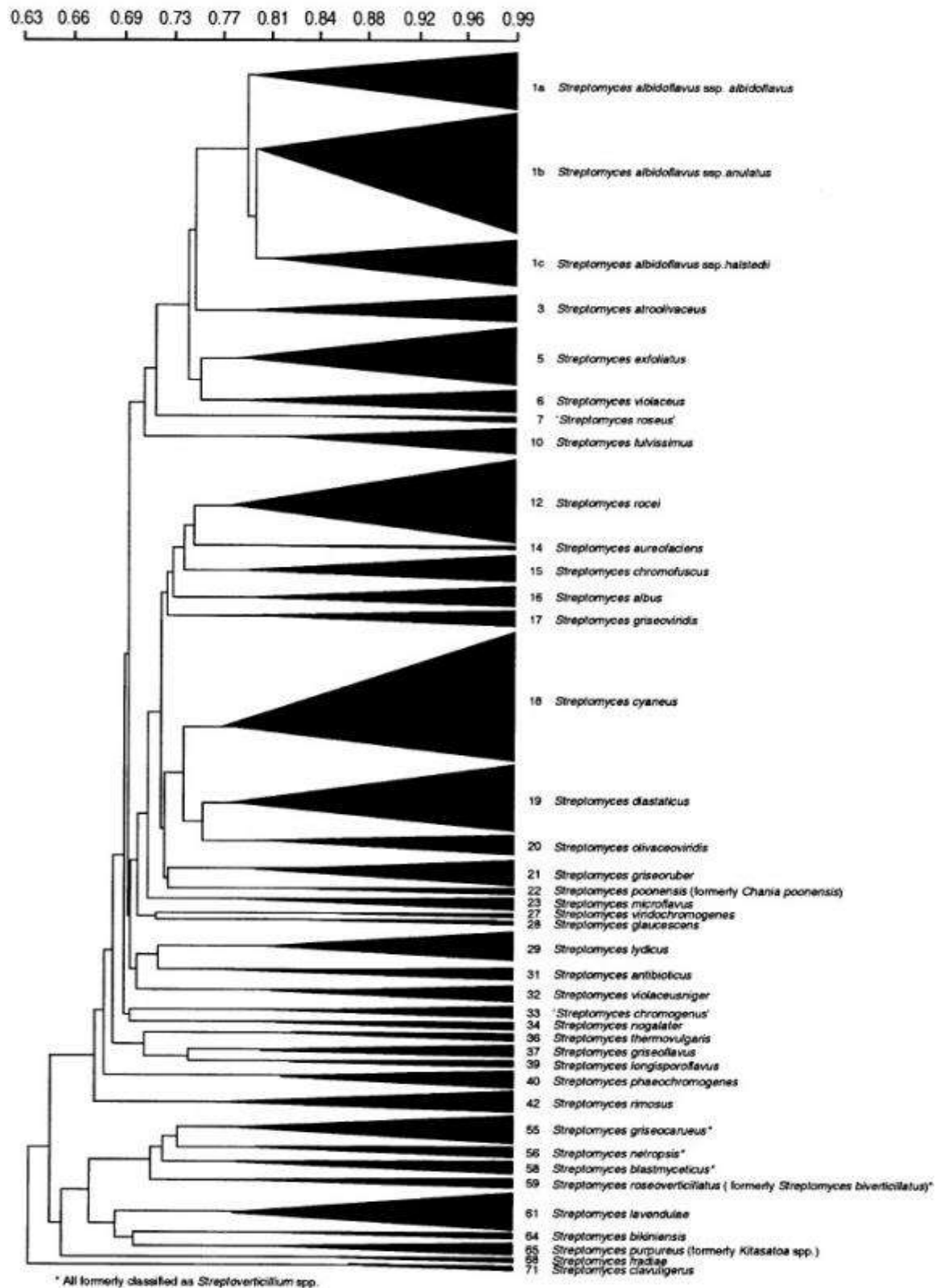


Figure 5. Dendrogramme simplifié représentant les principales classes taxonomiques du genre *Streptomyces* selon la classification numérique de Williams et *al.* (1983) (Anderson et Wellington, 2001).

I.5.3. Chimiotaxonomie et la caractérisation moléculaire

Additivement à la taxonomie numérique la classification des *Streptomyces* est basée sur des méthodes chimiotaxonomiques et moléculaires dont les tests phénotypiques et génotypiques supplémentaires utilisés sont les suivants:

Tableau 1. Les tests phénotypiques et génotypiques supplémentaires utilisées dans les méthodes chimiotaxonomiques et moléculaires selon (Bergey's Manual, 2012).

Le test utilisé	Référence
L'analyse de la paroi cellulaire	(Lechevalier et Lechevalier, 1970a, 1970b, 1970c).
Le profilage des acides gras	(Hofheinz et Grisebach, 1965; Lechevalier, 1977; Saddler <i>et al.</i> , 1986, 1987; Kroppenstedt, 1992).
Tests biochimiques rapides basés sur l'utilisation de substrats liés à la 4-méthyl-ombelliférone	(Goodfellow <i>et al.</i> , 1987b).
Tests sérologiques	(Ridell <i>et al.</i> , 1986).
Typage des phages	(Wellington et Williams, 1981; Korn-Wendisch et Schneider, 1992)
Curie-point pyrolyse MS de cellules entières	(Sanglier <i>et al.</i> , 1992; Ferguson <i>et al.</i> , 1997).
Profilage des protéines d'organismes entiers	(Manchester <i>et al.</i> , 1990; Goodfellow et O'Donnell, 1993; Lanoot <i>et al.</i> , 2002)
Comparaison des profils de protéines ribosomales	(Ochi, 1989, 1992, 1995)
Comparaison des séquences de l'ARNr 16S et 23S	(Stackebrandt <i>et al.</i> , 1991a, b)
Hybridation ADN-ADN	(Labeda, 1992)

Les deux méthodes qui ont montré des résultats fiables d'identification et qui sont largement utilisées: l'étude des aspects macroscopiques et des caractères culturels sur des milieux de cultures spécifiques et l'autre c'est le séquençage de l'ARNr 16S (Mellouli *et al.*, 2003; Fourati *et al.*, 2005; Ben Ameer *et al.*, 2006; Labeda *et al.*, 2012; Chaves *et al.*, 2018).

I.6. Bioactivité

Streptomyces est l'une des sources les plus importantes de molécules bioactives utilisées dans le domaine de la médecine et de l'industrie (**Chaves et al., 2018**) dont on trouve les antibactériens, les antifongiques, les antiviraux, les antiparasites, les anticancéreuses, les antioxydants, les herbicides, les insecticides, les immuno-modulateurs quels que soient immunostimulants ou immunosuppresseurs et certains d'entre eux sont utilisés en thérapie due à leur activité cytostatique et antitumorale (**Hamedi et al., 2017b; Law et al., 2017; Tata et al., 2019**)

Chaque espèce de *Streptomyces* est capable génétiquement de produire en moyenne plus de 30 métabolites secondaires différents d'une espèce à une autre (**Namil et al., 2020**).

À l'addition des antibiotiques qui sont le produit principal, les *Streptomyces* sont responsables de la production d'une large gamme des enzymes où il a été avéré que leurs génomes sont capables de coder pour plusieurs protéines allant jusqu'à 800 protéines chez *Streptomyces coelicolor* A3 (2) dont 147 d'entre eux sont des hydrolases, 7 cellulases et 5 sont des chitinases. Aussi des amylases, des protéines extracellulaires, des lipases extracellulaires comme le cas de *Streptomyces rimosus* R6-554W producteur des enzymes lipolytiques, alors que certains *Streptomyces* sont capables de produire des enzymes modifiants les composés pharmacologiques et des xénobiotiques (**Bergey's Manual, 2012**) et un grand nombre de régulateurs de différenciation des cellules eucaryotes, y compris des inhibiteurs et des inducteurs de l'apoptose (**Manteca et al., 2010**).

Tableau 2. Exemples de quelques molécules produites par le genre *Streptomyces* (**Solanki et al., 2008**).

Molécule	Source	Activité
Zorbamycin	<i>Streptomyces flavoviridis</i>	Antitumeur
Himastatin	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Antitumeur
Meilingmycin	<i>Streptomyces nanchangensis</i>	Antiparasitaire
Nanchangmycin	<i>Streptomyces nanchangensis</i>	Insecticide
Avermectin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Anthelminthique
Dunaimycins	<i>Streptomyces diastatochromogenes</i>	Immunosuppresseur, antimicrobien
Oligomycin	<i>Streptomyces avermitilis</i>	Inhibiteur de croissance cellulaire
YM-216391	<i>Streptomyces nobilis</i>	Anticancer
Fattiviracin A1	<i>Streptomyces microflavus</i>	Antiviral
FK 506	<i>Streptomyces tsukubaensis</i>	Antiviral

I.7. Importance des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont caractérisés par un potentiel élevé de production des métabolites secondaires dont plusieurs d'entre eux sont des antibiotiques et ils sont décrits depuis longtemps comme étant une source importante des composés pharmacologiquement actifs telle que les antitumeurs et les antiviraux, ils occupent un espace considérable dans les antibiotiques naturellement synthétisés connus en médecine tels que chloramphénicol (de *S. venezuelae*), fosfomycine (de *S. fradiae*), acide clavulanique (de *S. clavuligerus*) et avermectine (de *S. avermitilis*) (**Sharma et al., 2014; Fang et al., 2020**).

Au niveau du sol et de la rhizosphère, les *Streptomyces* sont utilisés comme PGPR (plantgrowth-promoting rhizobacteria) qui stimule la croissance des plantes tout en développant la disponibilité des nutriments (le carbone, l'azote, le phosphate,...etc) ce qui leur permet de pousser sur les sols pauvres en nutriments et les protègent contre les germes pathogènes et les conditions défavorables (**Viaene et al., 2016; Salwan et al., 2020**).

Chapitre II

***Production d'antibiotiques par les
Streptomyces***

II.1. Généralités

Le mot Antibiotique est composé de deux parties, Anti qui signifie « opposé à » et biotique qui est de nature grec et veut dire « la vie » (**Sakharkar et al., 2008**).

Les antibiotiques sont des métabolites de faible poids moléculaires produits par des microorganismes tels que les *Streptomyces* ou les champignons, et sont capables même à de faibles concentrations d'inhiber la croissance bactérienne en ciblant essentiellement les structures ou les fonctions bactériennes, telles que la membrane, la biosynthèse de la paroi cellulaire, la traduction, la transcription de l'ARN, la réplication et la synthèse d'ADN (**Lo Grasso et al., 2016; Stadler et Dersch, 2016; Francis, 2017**).

Depuis la découverte d'actinomycine D produit par *Streptomyces antibioticus* en 1940, la streptothricine produite par *Streptomyces lavendulae* en 1942 et la streptomycine par *Streptomyces griseus* en 1944 par Waksman et ses collègues, les Streptomycètes soient devenus une source très importante des antibiotiques, il a été estimé qu'elles sont responsables de 80% des antibiotiques produits par les actinobactéries qui produisent la plupart des antibiotiques connus (**Bergey's Manual, 2012; Barka et al., 2016**), avec environ 12400 métabolites bioactives dont 1100 sont des antibiotiques (**Hamedi et al., 2017b**).

Certaines espèces de *Streptomyces* sont capables de produire qu'un seul type d'antibiotique, tandis que d'autres produisent une gamme d'antibiotiques différents (**Barka et al., 2016**).

II.2. Antibiotiques produits par les *Streptomyces*

Tableau 3. Exemples des antibiotiques produits par les *Streptomyces* (Hughes et Andersson, 2001).

Classe d'antibiotique	Cible	Exemples
Beta-lactame	Penicillin binding Proteins (PBP)	Penicillines (benzylpenicilline, ampicilline, amoxycilline) Cephalosporines (cefotaxime, cephalexin, ceftazidime) Carbapenemes (imipeneme, meropeneme) Monobactames (aztreoname)
Aminoglycoside	Sous-unités ribosomales 30S, 50S	Gentamicine, neomycine, tobramycine, amikacine, streptomycine
Macrolide	Sous-unité ribosomale 50S	Erythromycine, lincomycine, azithromycine, clarithromycine
Tétracycline	Sous-unité ribosomale 30S.	Tétracycline, doxycycline, minocycline
Glycopeptide	Peptidoglycane de la paroi cellulaire	Vancomycin, teicoplanin
Chloramphenicole	Sous-unité ribosomale 50S.	Chloramphenicol
Rifamycines	ARN polymérase.	Rifamycin B

II.2.1 Antibiotiques inhibant la synthèse de la paroi bactérienne

Trois classes d'antibiotiques sont concernées: les β -lactamines, les glycopeptides et la fosfomycine.

II.2.1.1. β -lactamines

Les antibiotiques appartenant à cette classe interagissent avec les enzymes clés penicillin-binding proteins (PBPs) impliqués dans la synthèse de peptidoglycane de la paroi cellulaire bactérienne et en l'inhibant. Parmi les PBPs, on trouve les transglycosylases, les transpeptidases, les endopeptidases et carboxypeptidases (Pucci et Dougherty, 2008; Park *et al.*, 2020). Ce groupe est caractérisé par le cycle de β -lactame dans sa structure chimique (Mohr, 2016).

II.2.1.2. Glycopeptides

Découvert dans les années 1950s (Stadler et Dersch, 2016), ce sont des antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi bactérienne (exclusivement les bactéries Gram positive) en se liant au précurseur Lipide II, en empêchant son incorporation dans la synthèse de peptidoglycane. Ils sont largement utilisés dans le traitement des infections causées par des bactéries gram positives en particulier les souches multirésistantes aux antibiotiques d'enterococci, streptococci et staphylococci (Cardoso *et al.*, 2017; Blaskovich *et al.*, 2018; Santos-Beneit, 2018). Les deux glycopeptides largement utilisés sont : la vancomycine (figure 6) et la teicoplanine (Sköld, 2011).

La plupart des glycopeptides sont des molécules grandes et rigides qui ont un noyau heptapeptidique central avec au moins deux acides aminés non protéinogéniques aromatiques décorés par des glycosylations, des halogénations, des méthylations et des réticulations de leurs chaînes latérales (Cardoso *et al.*, 2017).

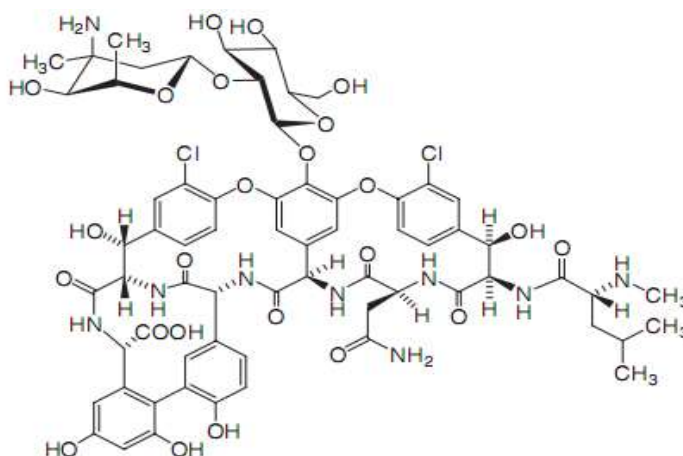


Figure 6. Structure chimique d'un glycopeptide (La vancomycine) (Sköld, 2011).

II.2.1.3. Fosfomycine

Il a été isolé pour la première fois en 1969 à partir de *Streptomyces fradiae* (ATCC 21096) par deux pharmaciens en Espagne et il a entré en utilisation dans les années 1970s (Aktas, 2020). La fosfomycine (C₃H₇O₄P) (figure 7) est une molécule avec un faible poids moléculaire (138 Da) dérivé d'acide phosphonique et produit aussi par autre *Streptomyces* que *Streptomyces fradiae* (ATCC21096), à savoir *S. viridochromogenes* (ATCC21240) et *S. wedmorensis* (ATCC21239). Il peut également être produit par synthèse. C'est un antibiotique bactéricide avec un large spectre d'activité contre plusieurs bactéries Gram-positives et Gram-négatives, y compris les entérocoques résistants à la vancomycine, les *Staphylococcus aureus* résistants à la méthicilline et les *Enterobacteriaceae* résistants aux carbapénèmes (Falagas *et al.*, 2016; Hashemian *et al.*, 2019; Aktas, 2020).

Il est doué d'empêcher la synthèse de la paroi cellulaire des bactéries par la liaison de façon irréversible à l'enzyme MurA, UDP-N-acetylglucosamine-enolpyruvyltransferase et en l'inhibant, cette enzyme qui est responsable de catalyser les premières phases de la synthèse du peptidoglycane, ou également par la réduction des PBP (les protéines de liaison à la pénicilline) (Silver, 2017; Hashemian *et al.*, 2019; Aktas, 2020).

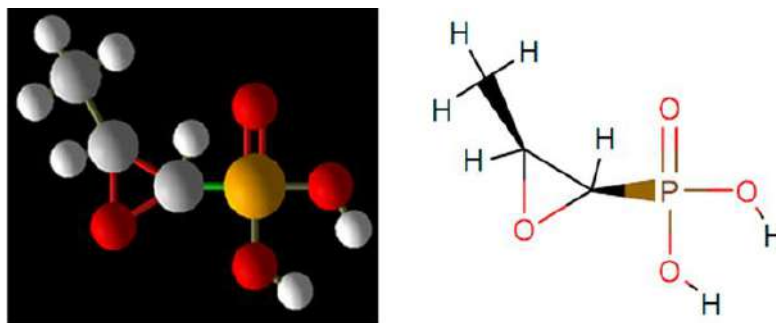


Figure 7. Structure chimique de la fosfomycine (Hashemian *et al.*, 2019).

II.2.2. Antibiotiques inhibant la synthèse des protéines

Sont principalement: les macrolides, les aminoglycosides, les tétracyclines et les phénicolés.

II.2.2.1. Macrolides et apparentés (MLS)

L'érythromycine (**figure 8**) est un macrolide découvert en 1952, produit par *Streptomyces erythreus*, cet antibiotique sert comme un bon exemple de groupe des macrolides. Le groupe MLS regroupe les macrolides, les lincosamides et les streptogramines qui ont différents dans leurs structures et similaires dans leurs mécanisme d'action (Sköld, 2011) qui se manifeste par la liaison à la sous-unité 50S du ribosome bactérien et inhibent la translocase et par conséquent inhibent la synthèse des protéines. La structure des macrolides est généralement constituée d'un cycle lactone macrocyclique de 12 à 16 chaines avec un sucre aminé lié à un acide glycosidique (Stadler et Dersch, 2016; Hamed *et al.*, 2017b).

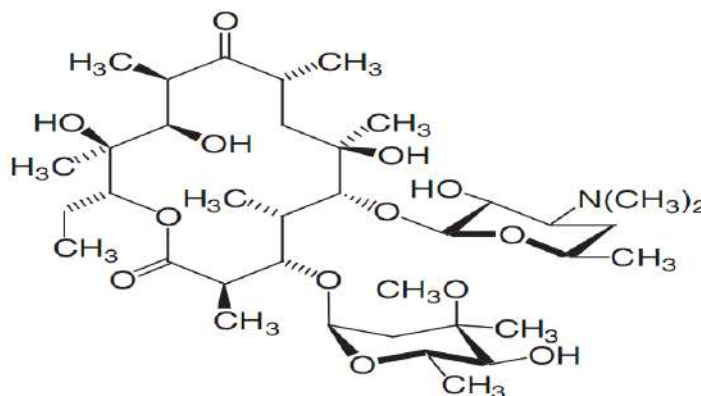


Figure 8. Structure d'un macrolide (Erythromycine) (Sköld, 2011).

II.2.2.2. Aminoglycosides

Le premier antibiotique de la classe des aminoglycosides qui a été isolé c'est la streptomycine (**figure 9**) par Schatz *et al.* (1944) à partir de *Streptomyces anulatus* subsp. *griseus* (ancien *S. griseus*) (Stadler et Dersch, 2016; Takahashi et Nakashima, 2018).

Les aminoglycosides se lient parfois de manière irréversible à la protéine S12 dans la sous-unité 30S du ribosome et influencent la liaison de l'ARNt de formylméthionine au ribosome conduisant à une traduction inexacte (lecture erronée), une correction d'épreuves et/ou une interruption prématurée de la synthèse des protéines (Carlos et Amáble, 2016; Hamedi *et al.*, 2017b).

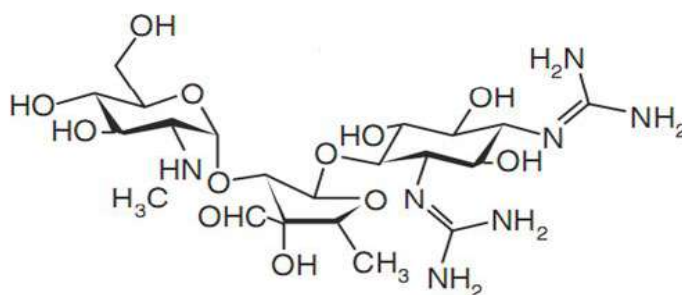


Figure 9. Structure d'un aminoglycoside (La streptomycine) (Hamedi *et al.*, 2017b).

II.2.2.3. Tétracyclines

Le premier antibiotique isolé de ce groupe était la chlortétracycline (auréomycine) produit par *Streptomyces aureofaciens*, par la suite, la tétracycline et l'oxytétracycline (**figure 10**) à partir de *Streptomyces rimosus* (Solecka *et al.*, 2012).

Les tétracyclines sont des antibiotiques à large spectre qui inhibent la synthèse des protéines chez les bactéries en se fixant sur la petite sous-unité ribosomale et en empêchant la liaison de l'aminoacyl-ARNt au site A du ribosome bactérien (Carlos et Amáble, 2016; Peng *et al.*, 2019). Ce sont des antibiotiques bactériostatiques alors qu'à des fortes doses, ils ont aussi un effet bactéricide (Hamedi *et al.*, 2017b).

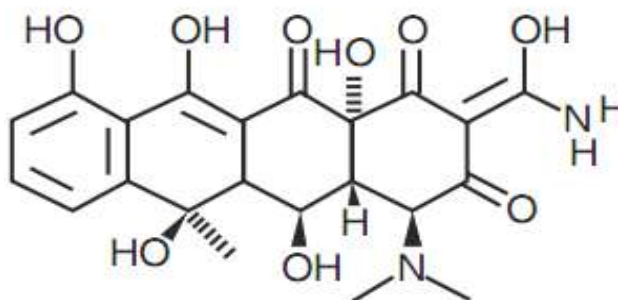


Figure 10. Structure d'un tétracycline (l'oxytétracycline) (Hamedi *et al.*, 2017b).

II.2.2.4. Phénicolés

Le chloramphénicol ($C_{11}H_{12}Cl_2N_2O_5$) (**figure 11**) isolé en 1947 à partir de *Streptomyces venezuelae*, est un antibiotique bactériostatique de la famille des phénicolés (**Hamza et al., 2018**).

Leur mode d'action est pareil à celui des macrolides où ils se lient de façon réversible (antibiotique bactériostatique) à la sous-unité 50S du ribosome et affecte l'activité de la peptidyltransférase et inhibe le transfert des acides aminés à la chaîne peptidique en croissance, ce qui va aboutir à l'inhibition de la synthèse des protéines (**Bouali et al., 2017**).

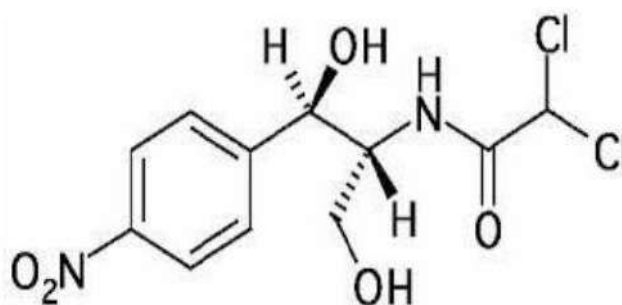


Figure 11. Structure du chloramphénicol (**Hamza et al., 2018**).

II.2.3. Antibiotiques agissant au niveau des acides nucléiques

Les *Streptomyces* produisent un range des antibiotiques qui ciblent la synthèse d'ADN/ARN. Les rifamycines ou autrement dit les ansamycines, sont des produits naturels issus de *Streptomyces spp.* avec un effet bactéricide et affectent la synthèse d'ARN en agissant au niveau de la sous-unité β de l'ARN polymérase et inhibent par conséquent la formation de la première liaison phosphodiester dans la chaîne d'ARN et empêchent l'initiation de la transcription (**Cambau et Guillard, 2012; Hamedi et al., 2017b**).

Les antibiotiques coumariniques dont on trouve la coumermycine et la novobiocine, sont des produits naturels produits par *Streptomyces spp.* responsable de l'inhibition des topoisomérases de type 2, l'ADN gyrase et la topoisomérase IV, en agissent par inhibition compétitive de l'hydrolyse de l'adénosine-5'-triphosphate (ATP) présent dans ces molécules (**Cambau et Guillard, 2012**).

II.2.4. Antibiotiques antifongiques

Les traitements antifongiques ciblent spécifiquement les composés de la paroi cellulaire des champignons qui les en distinguent des autres cellules des eucaryotes, on parle donc de la chitine, le glucane et l'ergostérol (**Murray, 2018**).

Les antibiotiques antifongiques produits par les *Streptomyces* sont généralement des polyènes macrolides qui ont une structure cyclique avec des nombreuses liaisons carbone-carbone conjuguées, dont on trouve la nystatine comme le premier antifongique humain d'origine actinobactéries fabriqué par *S. noursei*, l'amphotéricine B par *S. nodosus* ainsi que le natamycine produite par *S. natalensis*. Le composé polyénique induit la formation des pores au niveau de la membrane des champignons cibles qui va conduire à l'augmentation de perméabilité aux ions potassium et par la suite à la fuite de la cellule par le fait d'une interaction avec l'ergostérol constitutif de la membrane cellulaire (Sharma *et al.*, 2014; Hamedi *et al.*, 2017b).

Il existe aussi la classe des antimycines qui affecte la chaîne respiratoire mitochondriale en inhibant le flux d'électrons. Parmi les antimycines on a les urauchimycines qui ferment l'Urauchimycine B qui a montré un large spectre activité contre *Candida spp.* (Sharma *et al.*, 2014).

II.3. Facteurs influençant la production des antibiotiques

De nombreux facteurs peuvent affecter la production des antibiotiques, tels que la nature de l'inoculum, la composition du milieu de culture et les conditions de culture (pH, température et l'aération) (Saffroy, 2006).

De façon générale, la production des métabolites secondaires y compris les antibiotiques est liée au cycle de développement et a constitué un moyen de protection (Van der Heul *et al.*, 2018).

II.3.1. Milieu de culture de production

Le choix de milieu de culture est un facteur limitant pour la production, donc il faut qu'il réponde aux besoins nécessaires: des sources d'énergie, de carbone, d'azote ainsi que des sels minéraux et des oligo-éléments, quel que soit un milieu synthétique composé des éléments définis ou milieu complexe comportant par exemple des farines ou des extraits de viande (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

II.3.2. Inoculum

La production des métabolites secondaires ainsi que le potentiel de croissance peuvent être influencés par la nature de l'inoculum (effectué soit à partir de spore soit de cellule végétative) et il se varie d'une souche à un autre. Des expériences ont été effectuées sur la souche *Streptomyces coelicolor* A3(2) ont montré que l'ensemencement à partir de cellules végétatives a assuré un taux de croissance assez faible en comparant avec un ensemencement

à partir de spores, c'est carrément le contraire chez la souche *S. natalensis* qui a produit de l'ennatamycine à partir d'un ensemencement de spores environ 40% supérieur d'une production obtenu avec des cellules végétatives (Saffroy, 2006).

II.3.3. Influence des sources nutritionnelles

Plusieurs études réalisées ont montré les effets de nutrition et de l'environnement sur le processus de production (à voir son déclenchement et son intensité) qui aura lieu au cours de l'idiophase quand la croissance devient limitée par l'un des substrats du milieu (les sources de carbone, d'azote et de phosphate) (Doull et Vining, 1990; Saffroy, 2006).

II.3.4. Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation

Les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation peuvent affecter considérablement la production des métabolites secondaires.

L'effet du pH pendant la période de fermentation a été confirmé par des études réalisées sur la souche *Streptomyces aureofaciens* où il était avéré qu'un pH acide favorise la production de la chlorotétracycline alors qu'un pH basique favorise la sécrétion de la tétracycline.

Un optimum de croissance et de production des métabolites secondaires est assuré par une incubation à une température correspond à la température optimale de croissance.

La production de métabolites secondaires est aussi influencée par l'agitation qui permet d'assurer l'apport en oxygène par l'aération et le fait de mélanger les éléments nutritifs dans le milieu de fermentation, chez les *Streptomyces*, il est compris entre 200 et 250 rpm (et c'est la raison pour laquelle on a utilisé un shaker de 250 rpm dans notre étude).

Concernant le temps d'incubation, il est un facteur déterminant qui se varie d'une espèce à une autre. Comme par exemple le cas de la souche *Streptomyces rochei* AK39 qui produit un métabolite antifongique, cette production commence après quatre jours d'incubation pour atteindre un maximum après huit jours (Smaoui, 2010).

Partie II

La partie expérimentale

Chapitre III

Matériels et méthodes

III.1. Lieu de stage

La partie expérimentale de ce mémoire a été réalisée au niveau du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure. Kouba-Alger, ce laboratoire s'intéresse à :

- Les actinobactéries et les antibiotiques à intérêt médical et vétérinaire.
- Champignons toxigènes et les mycotoxines.
- Les microorganismes, les antibiotiques et les biomolécules d'intérêt agronomique.
- Taxonomie des actinobactéries des écosystèmes sahariens et potentialités antagonistes.

Ce travail rentre dans l'axe de recherche du laboratoire LBSM (actinobactéries et antibiotiques) et il a été réalisé dans une période de deux mois (juillet et août) de l'année 2019.

III.2. Matériels

III.2.1. Provenance de la souche AH08 de *Streptomyces*

L'isolat d'actinobactéries noté AH08 utilisé dans cette étude, a été isolée en 2016 par la méthode de suspensions-dilutions (**Rapilly, 1968**), sur milieu « chitine-vitamines B agar » (CH.V) de **Hayakawa et Nonomura (1987)** à partir d'un échantillon de sol saharien prélevé de la région de Tamanrasset (**Ahaggar station armoise** (170 km a Tamanrasset)). La souche a été conservée à 4°C, sur le milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) incliné.

III.2.2. Germes cibles

La plupart des germes cibles utilisés sont des germes pathogènes ou toxigènes pour l'homme et principalement multirésistants aux antibiotiques en vue d'évaluer les propriétés antagonistes et antimicrobiennes de la souche AH08 à étudier. On rencontre des bactéries à Gram négatives: *Escherichia coli* (ATCC8739), *Escherichia coli* (ATCC25), *Salmonella typhi*, *Agrobacterium*, *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027), *Acinetobacter baumannii* (S54), des bactéries à Gram positives: *Listeria monocytogenes* (ATCC13932), *Staphylococcus aureus* (MRSA639c), *Staphylococcus aureus* (S), *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilise* (ATCC663) ainsi que des champignons: *Aspergillus westerdijkiae* (ATCC3174), *Aspergillus carbonarius* (M333), *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus fumigatus*, *Fusarium culmorum*, *Fusarium poea*, *Penicillium exapansum*, *Penicillium glabrum*, *Umbelopsis ramanniana* (NRRL1829) et *Candida albicans*.

Ces germes proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de Kouba Alger, Algérie.

III.2.3. Milieux de culture

Les milieux de culture utilisés dans cette étude sont indiqués dans l'**annexe 2** :

- Le milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2), ISP4, milieu «chitine-vitamines agar» (CHV).
- Des milieux synthétiques (**MS**) et milieux semi synthétiques (**MSS**), ces deux derniers sont additionnés de 10g/l de sources de carbone : amidon, dextrine et glycérol. (**Bouras et al., 2005**).

III.2.4. Appareillage

Les appareils utilisés sont : Shaker «New Brunswick Scientific», Micro-centrifugeuses, Centrifugeuses JUAN E96, Balance, pH-mètre, Etuve, Autoclave, Vortex, Rotavapeur, Micropipette de 10 µl, 100µl, 1000µl.

III.3. Méthodes

III.3.1. Étude morphologique

L'observation macromorphologique et micromorphologique des colonies de la souche AH08, poussant sur différents milieux de culture, nous a permis de déterminer les caractéristiques culturales et micromorphologiques de l'isolat AH08 d'actinobactérie.

Les caractéristiques macromorphologiques sont déterminées sur différents milieux de culture solides: ISP 2 et ISP 4 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)**, ainsi que sur le milieu CH.V (**Waksman, 1961**). La composition des milieux de culture est donnée dans l'**annexe 2**.

Cette étude sert à noter, aux 12^{ème}, 14 jours d'incubation à 30 °C, la croissance de la souche AH08, l'aspect et la couleur de mycélium aérien 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 Centroid Color ISCC-NBS).

De même, la souche (poussant sur les mêmes milieux de culture cités précédemment) a 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.3.2. 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 différentes 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 3**.

III.3.2.1. Utilisation des composés glucidiques

Ce test a pour objectif d'apprécier la croissance de la 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)** (**annexe 3**).

III.3.2.2. Utilisation de divers autres composés organiques

L'hydrolyse ou non de certains composés organiques a été également testée pour la souche AH08. 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 3**.

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.3.2.3. Production de nitrate réductase

La production de la nitrate réductase est mise en évidence sur un bouillon nitraté (**Marchal et al., 1987**) (**annexe 3**) contenu dans des tubes à vis, à raison de 5 mL par tube. Pour la souche AH08, 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.3.2.4. Production de pigments mélanoides

La production de pigments mélanoides diffusibles (brun-noirâtre à noir-brunâtre) par la souche AH08 a été mise en évidence sur les milieux ISP 6 et ISP 7 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)** (**annexe 3**). 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.3.3. Identification moléculaire

III.3.3.1. Séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S et phylogénie de la souche AH08

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 notre souche. Les étapes suivies lors de la PCR sont décrites dans l'**annexe 4**.

III.3.3.2 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 de la souches AH08 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 la souche AH08, 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.3.4. Préculture et cultures de production des activités antimicrobiennes

III.3.4.1. Milieux de culture de production

Les milieux de culture (liquides) utilisés sont des milieux synthétiques (MS) et semi-synthétiques (MSS) on l'additionnant 10g/L des différentes sources de carbone: amidon, glycérol, dextrine, afin de tester lequel assure une production optimale d'antibiotiques.

III.3.4.2. Inoculum

La souche AH08 estensemencée par la méthode de stries à la surface d'un milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) solide (Shirling et Gottlieb, 1966) à pH 7.2 qui lui assure une meilleure croissance et sporulation, puis incubée à 28 °C pendant 10 jours.

III.3.4.3. Pré-culture

La préculture est préparée par l'ajout de 2 cylindres d'agar de 6 mm percés par une micropièce à partir des boîtes de culture mûre de la souche AH08 déjàensemencées sur le milieu ISP2 (Bouali *et al.*, 2017) dans un erlenmeyer de 100 ml contient 50 ml de milieu de culture (Milieu synthétique ou semi synthétique). Les erlenmeyers sont ensuite incubés dans un shaker (de la marque New Brunswick Scientific) à 30 °C avec une agitation de 250 rpm pendant 2 à 3 jours (Xinxuan *et al.*, 2010).

III.3.4.4. Culture pour les cinétiques de production

Un volume de 3 à 5 ml de préculture est introduit par une micropipette dans un Erlenmeyer de 500 ml contient 100 ml de milieu de culture avec les même sources de carbone utilisés dans la préculture dont chaque prélèvement s'effectuer entre les mêmes milieux de culture. Les Erlenmeyers sont ensuite incubés dans un shaker à 30 °C avec une agitation de 250 rpm pendant 10 jours. La **figure 12** illustre les différentes étapes suivies pour la cinétique de production des antibiotiques.

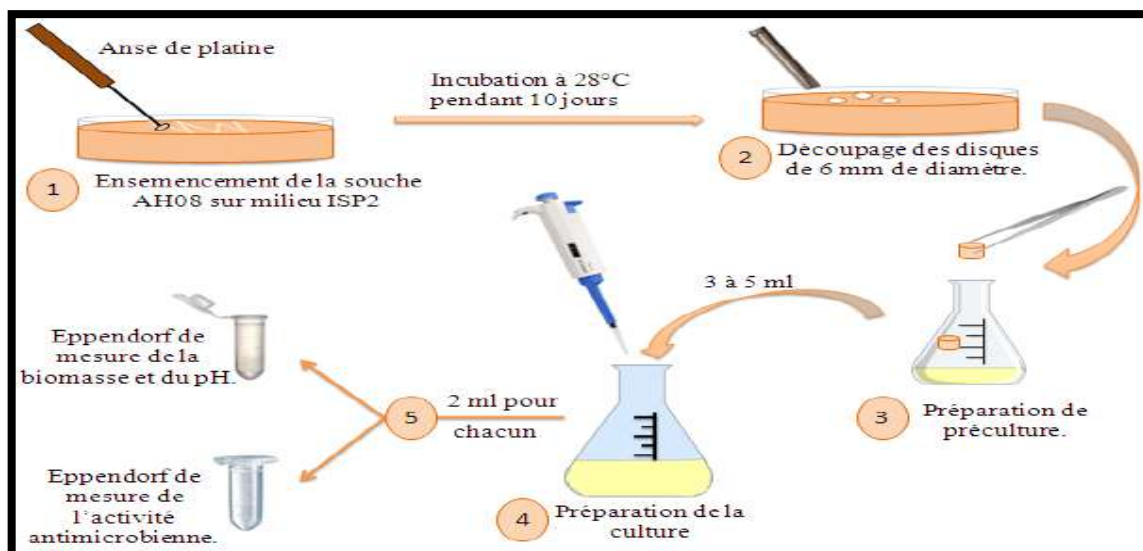


Figure 12. Schéma simplifié du protocole de la cinétique de production des antibiotiques.

III.3.5. Activité antagoniste de la souche AH08 (milieu synthétiques et semi synthétiques)

L'antagonisme est mesuré par la méthode des cylindres d'agar (**Patel et Brown, 1969**) (**figure 13**) contre les germes cibles déjà cités, qui sont introduits sous forme de suspension dans un milieu ISP2 qui va être coulé par la suite dans des boîtes de pétri vides et stériles où chaque boîte reçoit 5 cylindres d'agar de 10 mm prélevés de différentes boîtes de la souche ensemencée dans des milieux synthétiques et semi synthétiques avec les 3 sources de carbone, les milieux sont : MS A, MS D, MS L, MSS A, MSS D, MSS L et aussi le milieu ISP2.

La zone d'inhibition est mesurée après une incubation à 28 °C/48 h pour les champignons et à 37 °C/24 h pour les bactéries.

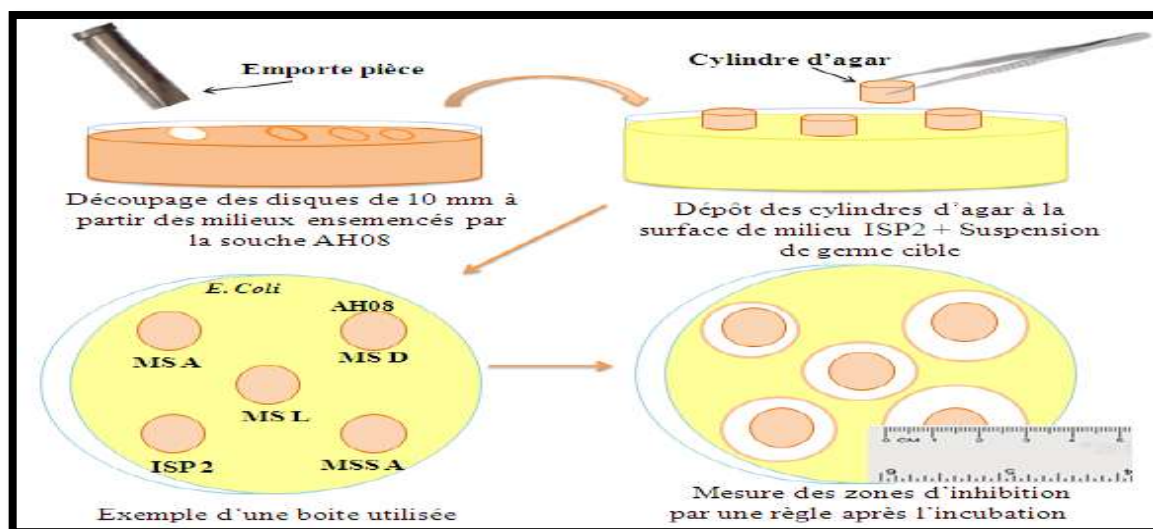


Figure 13. Mise en évidence de l'activité antagoniste de la souche AH08 par la méthode des cylindres d'agar.

III.3.6. Mesure de l'activité antibactérienne et antifongique, de la croissance et du pH

III.3.6.1. Mesure de l'activité antibactérienne

Un échantillon de 2 ml est prélevé aseptiquement à partir de la culture dans des eppendorfs stériles par une pipette pasteur chaque jour dans la période de 10 jours de suivi de la cinétique. Après une centrifugation à 13200 rpm pendant 10 min dans une micro-centrifugeuse des eppendorfs (sigma 1-14), les eppendorfs sont conservés dans la chambre froide à 6 - 8 °C.

La mesure de l'activité se fait par la méthode de diffusion de puits établi par **Aszalos (1986) (figure 14)** contre les germes suivants: deux bactéries à Gram positive *Listeria monocytogenes* (ATCC13932), *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) et une bactérie à Gram négative *Escherichia coli* (ATCC8739).

Après avoir préparé le milieu ISP2 et les suspensions des germes cibles, un volume de 170 µl de suspension de germe estensemencé en masse dans 200 ml de milieu ISP2 vrai, le mélange est coulé en boîtes de pétri vides et stériles. Après la solidification du milieu, une aliquote de 100 µl de surnageant des eppendorfs est introduit dans le puits de 10 mm (5 puits par boîte) préalablement perforée par un emporte-pièce puis placé dans un réfrigérateur à 4 °C pendant 2 h (pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant momentanément la croissance des germes-cibles) avant d'être incubé à 37 °C/24 h. Les zones d'activités sont mesurées par une règle en mm.

III.3.6.2. Mesure de l'activité antifongique

La mesure de l'activité antifongique comme le cas de la mesure de l'activité antibactérienne s'effectue par la même méthode de diffusion de puits d'**Aszalos (1986) (figure 14)** (décrite précédemment). Les germes cibles sont les champignons : *Aspergillus carbonarius* (M333), *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium culmorum*, *Umbelopsis ramanniana* (NRRL1829). L'incubation est à 28°C/48 h et la zone d'activité est toujours mesurée en mm.

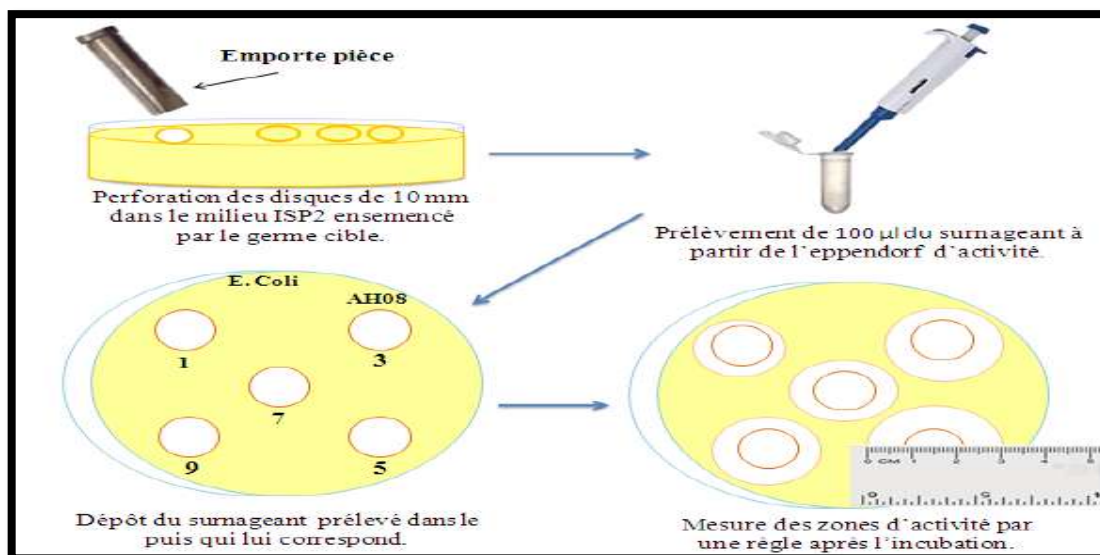


Figure 14. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche AH08 par la méthode de diffusion de puits d'Aszalos (1986).

III.3.6.3. Mesure du pH

Un prélèvement journalier de 2 ml est effectué aseptiquement à partir des Erlenmeyers de la culture par une pipette pasteur stérile après une agitation manuelle de l'Erlenmeyer, dans des eppendorfs aussi stériles. Après la centrifugation de ces eppendorfs à 13200 rpm pendant 10 min par une micro-centrifugeuse des eppendorfs (sigma 1-14), le surnageant est récupéré en vue de mesurer le pH en utilisant un pH mètre (Hanna Instruments PH211).

III.3.6.4. Mesure de croissance (Biomasse)

Cette mesure est effectuée selon la méthode de **Pfefferle et al. (2000)**. Les eppendorfs contenant l'échantillon (2ml/tube) de la culture sont préalablement tarés (avant de prélever) par une balance. Après la centrifugation à 13200 rpm pendant 10 min le surnageant survit la mesure de pH et le culot est lavé par centrifugation à deux reprises l'une avec de 2 ml d'HCL pour éliminer le CaCO_3 résiduel et l'autre avec de l'eau distillée (**Bouali et al., 2017**) et ensuite placé dans l'étuve jusqu'au séchage complet. Afin de mesurer la biomasse, on soustrait le poids après séchage du poids de l'eppendorf vide.

III.3.7. Extraction des substances antimicrobiennes à partir des milieux de production

III.3.7.1. Extraction d'antibiotique par des solvants

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. 4 solvants de polarité croissante sont utilisés: le n-hexane, le

dichlorométhane, l'acétate d'éthyle et le n-butanol. Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction (Valan Arasu, 2009).

Après une culture agitée (250 rpm) d'une durée correspondant au jour optimal de production (dans ce cas, nous avons retenu le 5^{ème} jour), à une température de 30°C sur milieu MSA liquide, le filtrat de culture est récupéré par centrifugation. Quatre solvants organiques de polarités différentes (n-hexane, dichlorométhane, n-butanol et acétate d'éthyle) sont testés pour l'extraction des antibiotiques. Les extraits organiques et aqueux sont concentrés à sec par un rotavapeur de la marque BUCHI Rotavapor R210, puis récupérés dans 0,5 mL de méthanol pour tester leur activité par la méthode des disques de papier (80 µL par disque) contre *Staphylococcus aureus* (MRSA639c), *Escherichia coli* (ATCC8739) et *Listeria monocytogenes* (ATCC13932).

III.3.7.2. Antibiographie

Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction, l'extrait méthanolique brut, ainsi que les différents extraits organiques, ont été testés pour leurs activités antimicrobiennes par antibiographie sur disques de papier buvard (6 mm) contre *Staphylococcus aureus* (MRSA 639c), *Escherichia coli* (ATCC8739) et *Listeria monocytogenes* (ATCC13932). Les disques de papiers sont ainsi imprégnés de 80 µL de l'extrait à tester et séchés complètement à l'aide d'un séchoir à froid. Ils sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu ISP 2 (12 g/L d'agar) pré-ensemencées par les germes-cibles et coulé en boîtes de Pétri.

Les boîtes sont mises à 4 °C durant 2 h pour permettre la diffusion des substances actives tout en inhibant de manière temporaire la croissance du germe-cible. Elles sont ensuite incubées à 30 °C pendant 24 à 48 h. L'activité antibiotique est appréciée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition qui apparaissent autour des disques.

Chapitre IV

Résultats et discussion

IV.1. Caractérisation de la souche *Streptomyces* AH08

IV.1.1. Caractéristiques phénotypiques

Les caractéristiques culturales et micro-morphologiques des isolats AH08 ont été déterminé après une observation macromorphologique et micro-morphologique des colonies de la souche poussant sur différents milieux de culture et les caractéristiques macromorphologiques sont déterminées sur les milieux de culture suivants: ISP 2 et ISP 4 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)**, ainsi que sur le milieu CH.V (**Waksman, 1961**).

Cette caractérisation sert à noter la croissance de la souche AH08, l'aspect et la couleur des mycéliums aériens et du substrat, ainsi que la production et la couleur des pigments diffusibles dans les différents milieux dans les 12^{ème}, 14 jours d'incubation à 30 °C.

Résultats

Les résultats de l'étude macromorphologique de l'isolat AH08, sont rapportés dans le **tableau 4** et la **figure 15**.

L'isolat AH08 présente une croissance et une sporulation abondantes sur le milieu solide ISP2, ISP4, et gélose nutritive, sont également favorables pour la croissance de l'isolat AH08, cependant, la production du mycélium aérien (MA) reste moyenne sur les deux milieux et faible sur la gélose nutritive, l'isolat AH08 se caractérise par un MA Gris à gris bleuâtre sur le milieu ISP2 , Gris à gris brunâtre sur le milieu ISP4 et Gris à jaune claire sur le milieu GN, le mycélium du substrat (MS) de couleur Orange vif sur le milieu ISP2, Jaune vif au jaune orange sur le milieu ISP4 et jaune clair sur le milieu GN, ainsi qu'un pigment soluble (PS) jaune brunâtre à jaune orangé vif selon les milieux.

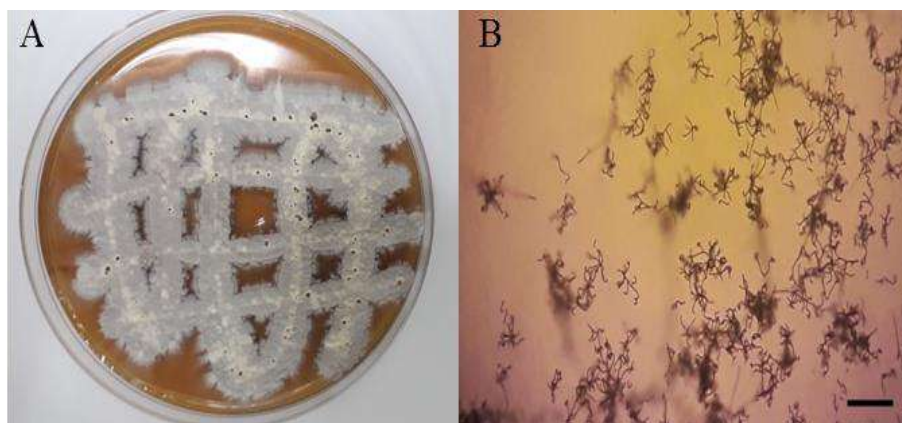


Figure 15. Macro-morphologie (A) et micro-morphologie (B) avec microscopie optique des chaînes de spores de la souche AH08 cultivée sur ISP2 pendant 14 jours à 30 °C, bar 100µm.

Tableau 4. Caractéristiques macro-morphologiques de la souche AH08 sur différents milieux après 14 jours d'incubation

Milieu gélosé	Croissance	Production et couleur de :		Pigment soluble
		Mycélium aérien	Mycélium du substrat	
ISP2	++	+ Gris à gris bleuâtre	Orange vif	Orange vif
ISP4	++	++ Gris à gris brunâtre.	Jaune orange	Jaune vif à jaune orange

IV.1.2. Caractéristiques physiologiques

La caractérisation physiologique consiste à réaliser une série de tests physiologiques pour but de discriminer les espèces appartenant aux différentes genres (**Whitman et al. (2012) (in: Bergey's manual, 2012)**). Ces tests sont :

- ✓ Test de croissance de la souche AH08 en présence de 20 composés glucidique utilisés comme étant la seule source de carbone dans le milieu de base.
- ✓ L'hydrolyse de certains composés organiques par la souche selon les méthodes de: **Gordon et al. (1974)**, la méthode de **Marchal et Bourdon (1973)**, la méthode de **Marchal et al. (1987)** et la méthode de **Sierra (1957)** dont chaque méthode est utilisé pour des composé organique précis et différents.
- ✓ La production de la nitrate réductase qui est mise en évidence sur un bouillon nitraté (**Marchal et al., 1987**).
- ✓ La production de pigments mélanoides diffusibles par de la souche AH08 qui a été mise en évidence sur les milieux ISP 6 et ISP 7 recommandés par **Shirling et Gottlieb (1966)**.

Résultats

Les caractéristiques physiologiques de la souche AH08 sont données dans le **tableau 5**. Elle peut utiliser toutes les sources de carbone testées, à l'exception du D-sorbitol. La gélatine, le citrate, l'amidon et la tyrosine ont été hydrolysés, mais le lactate ne l'est pas. Le test était positif pour la production de nitrate réductase. Il n'a pas pu croître jusqu'à 3% (p / v) de NaCl, et aucune croissance n'a été observée à 50 ° C.

Tableau 5. Caractéristiques physiologiques de la souche AH08 en comparaison avec l'espèce la plus proche *Streptomyces djakartensis* NBRC15409^T (AB184657).

Tests	AH08	<i>Streptomyces djakartensis</i> NBRC 15409 ^T (AB184657)
Utilisation de la source de carbone:		
L-arabinose	+	+
Fructose	+	-
D-Glucose	+	+
Inositol	+	+
Mannitol	+	+
Raffinose	+	+
L-rhamnose	+	+
D-sucrose	+	+
D-xylose	+	-
Cellulose	+	-
D- Galactose	+	+
D- sorbitol	-	nd
Melibiose	+	nd
Hydrolyse de:		
Gélatine	+	nd
Citrate	+	+
Lactate	—	nd
Amidon	+	nd
Tyrosine	+	nd
Réduction de nitrate	+	nd
Croissance en présence de:		
5% NaCl (w/v)	+	nd
Croissance à 50°C	—	nd

IV.1.3. Identification moléculaire

Résultats

L'analyse phylogénétique utilisant la séquence du gène de l'ARNr 16S (1438 paires de bases) a confirmé que la souche AH08 appartenait au genre *Streptomyces*. La séquence a été

déposée dans GenBank /EMBL/DDBJ sous le numéro d'accès MT626100. Le niveau de similitude le plus élevé était de 99,57 % avec *Streptomyces djakartensis* NBRC15409^T.

L'arbre phylogénétique obtenu en appliquant la méthode de neighbor-joining illustrée dans la **figure 16**, a montré que la souche AH08 forme une position phylogénétique distincte avec des espèces étroitement apparentées du genre *Streptomyces*. Cependant, notre souche se distingue de *S. djakartensis* par certaines propriétés phénotypiques comme la couleur du mycélium aérien (blanc à beige pour *S. djakartensis*), l'utilisation du fructose, du D-xylose et de la cellulose (Huber *et al.*, 1962).

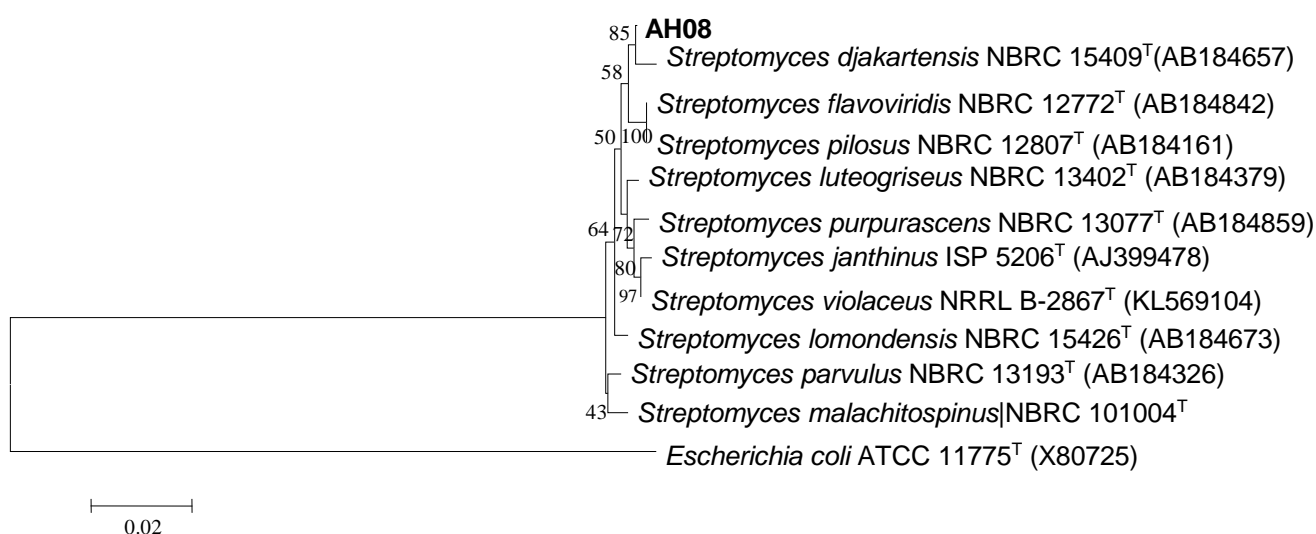


Figure 16. Arbre phylogénique basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S montrant les relations entre la souche AH08 et toutes les espèces de souches de *Streptomyces*.

Note: Les nombres aux nœuds indiquent les pourcentages de support bootstrap basés sur l'analyse de neighbor-joining de 1000 ensembles de données rééchantillonnés, seules les valeurs supérieures à 50% sont données. Bar, 0,02 substitutions par position de nucléotide. La séquence d'*Escherichia coli* ATCC 11775^T (X80725) a été utilisée comme outgroupe.

Discussion

L'ensemble de ces caractéristiques morphologiques et physiologiques permet de rattacher l'actinomycète AH08 au genre *Streptomyces* (Holt *et al.*, 1994). Arbre phylogénique basé sur des séquences de gènes d'ARNr 16S montrant les relations entre la souche AH08 et toutes les espèces de souches de *Streptomyces*. Les nombres aux nœuds indiquent les pourcentages de support bootstrap basés sur l'analyse de neighbor-joining de 1000 ensembles de données rééchantillonnés: seules les valeurs supérieures à 50% sont

données. Bar, 0,02 substitutions par position de nucléotide. La séquence d'*Escherichia coli* ATCC11775T (X80725) a été utilisée comme outgroupe qui concerne l'isolat AH08, les données phylogénétiques basées sur le séquençage de l'ADNr 16S ont permis de le rapprocher notre isolat à l'espèce *Streptomyces djakartensis* NBRC15409^T(AB184657) (Huber *et al.*, 1962), avec un taux de similitude de 99,57%. Les données phénotypiques de cette espèce (couleur des mycélia aérien et du substrat, production de pigments solubles, morphologie des chaînes de spores et dégradation de 09 sucres) (Huber *et al.*, 1962; Shirling et Gottlieb, 1968a; Nonomura, 1974) correspondent bien à celle de l'isolat AH08. La seule différence réside en la production d'un pigment soluble jaune-orangé vif chez AH08 sur le milieu synthétique (Milieu synthétiques avec amidon), lequel est absent chez *Streptomyces djakartensis*. Cependant, au vu des taux élevés souvent observés au niveau des séquences de l'ADNr 16S des différentes espèces de *Streptomyces* et qui peuvent atteindre parfois même 100% comme c'est le cas entre les deux souches types de *S. pilosus* NBRC 12807T (Ettlinger *et al.*, 1958) et *S. flavoviridis* NBRC 12772T (Preobrazhenskaya, 1986), il est toujours indispensable de compléter l'identification par des études d'hybridation ADN-ADN pour enlever toute ambiguïté spécialement conçue pour l'identification des espèces. Ces mêmes critères phénotypiques ont été utilisés dans les volumes de 1989 et 1994 du Manuel de Bergey pour cette discrimination sur la base de ces critères.

IV.2. Activité antagoniste de la souche AH08 (milieux synthétiques et semi synthétiques)

IV.2.1. Résultats

Le pouvoir antagoniste de la souche AH08 a été évalué par la méthode des cylindres d'agar dans les milieux: MS A, MS D, MS L, MSS A, MSS D, MSS L et le milieu ISP2 contre 5 bactéries à Gram positif, 6 bactéries à Gram négatif, 10 champignons. Les résultats de l'activité antagoniste sur le milieu ISP2 (qui est considéré comme le meilleur milieu de fait qu'il a assuré l'activité antagoniste la plus importante) sont figurés dans le **tableau 6** et la **figure 17**.

Les germes qui sont révélés les plus sensibles sont les bactéries dont on trouve par ordre décroissant: *Micrococcus luteus* où le diamètre de la zone d'inhibition atteint jusqu'à 57 mm (la valeur la plus élevée), *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) avec une zone d'inhibition de 40 mm de diamètre, *Agrobacterium* (37 mm), *Escherichia coli* 25 (36 mm), *Staphylococcus aureus* (S) (32 mm), *Bacillus subtilis* (ATCC663) (30 mm), *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) (28 mm), *Escherichia coli* (ATCC8739) et *Salmonella typhi* (25 mm), *Acinetobacter baumannii* (S54) (24 mm), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC9027)

(19 mm), cependant, les champignons sont mis en ordre décroissant comme suit: *Aspergillus fumigatus* (40 mm), *Fusarium parasiticus* (28 mm), *Penicillium glabrum* (26 mm), *Fusarium culmorum* (24 mm), *Aspergillus carbonarius* (M333) et *Umbelopsis ramanniana* (NRRL1829) (23 mm), *Aspergillus westerdijkiae* (ATCC3174) (22 mm), *Aspergillus ochraceus* (18 mm), *Penicillium exapansum* (16 mm) et finalement la levure *Candida albicans* (M3) (15 mm).



Figure 17. Activité antagoniste de la souche *Streptomyces* AH08 contre *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) (Sa 639) et *Listeria monocytogenes* (Lm) sur le milieu ISP2.

Tableau 6. Activité antagoniste de la souche AH08 par la méthode de cylindres d'agar sur le milieu ISP2.

Microorganisme-cible	Zone d'inhibition (mm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (MRSA639c)	40
<i>Staphylococcus aureus</i> (S)	32
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC13932)	28
<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC663)	30
<i>Micrococcus luteus</i>	57
<i>Escherichia coli</i> 25	36
<i>Escherichia coli</i> (ATCC8739)	25
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC9027)	19
<i>Acinetobacter baumannii</i> (S54)	24
<i>Salmonella typhi</i>	25
<i>Agrobacterium</i>	37
<i>Aspergillus carbonarius</i> (M333)	23
<i>Aspergillus westerdijkiae</i> (ATCC3174)	22
<i>Aspergillus ochraceus</i>	18
<i>Aspergillus fumigatus</i>	40
<i>Fusarium culmorum</i>	24
<i>Fusarium poea</i>	28
<i>Candida albicans</i> (M3)	15
<i>Umbelopsis ramanniana</i> (NRRL1829)	23
<i>Penicillium exapansum</i>	16
<i>Penicillium glabrum</i>	26

IV.2.2. Discussion

Les résultats du pouvoir antagoniste de la souche AH08 ont été évalués par la méthode de cylindre d'agar sur les milieux synthétiques et semi synthétiques avec les 3 sources de carbone et aussi sur le milieu ISP2 contre les germes cibles cités dans le **tableau 6**.

Le milieu ISP2 qui a assuré l'activité antagoniste la plus importante par rapport aux autres milieux de culture utilisé est connu comme un milieu favorable à la production des antibiotiques, plusieurs travaux au sein de Laboratoire (LBSM) utilisent l'ISP2 comme un milieu de production des antibiotiques (**Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007**).

La souche AH08 est avérée comme active contre tous les germes cibles testés, et les plus grandes activités antagonistes ont été obtenues contre les bactéries à Gram positif, en particulier contre *Micrococcus luteus* avec une zone d'inhibition de 57 mm de diamètre, puis après les bactéries à Gram négatif avec des zones d'inhibition compris entre 37 mm et 24 mm et les champignons avec des zones d'inhibition entre 40 mm et 16 mm alors que la levure *Candida albicans* (M3) est le moins sensible (15 mm). Ces résultats rejoignent fortement ceux obtenus par **Yekkou et al. (2015)** réalisé sur une souche de *Streptomyces* vivant dans le sol du Sahara, qui a montrée une activité contre toutes les bactéries, les champignons filamenteux et les levures dont *Candida albicans* c'était parmi les germes les moins sensibles, la faible sensibilité des levures est détectée aussi par l'étude de **Khebizi et al. (2017)** réalisé sur la souche *Streptomyces* sp. HG29. (**Sabaou et al., 1998; Prescott et al., 2002; Hasavada et al., 2006**) ont mentionné que les bactéries à Gram positif apparaissent plus sensibles aux molécules bioactives des actinomycètes en comparaison avec les bactéries à Gram négatif.

L'activité de notre souche est meilleure que celle signalée par **Boudjelal et al. (2011)** sur des souches d'actinobactéries de genre *Saccharomonospora* qui ont montré une activité intéressante contre les bactéries à Gram négatif et l'absence d'activité contre les bactéries à Gram positif et les champignons.

Des isolats de *Streptomyces* à large spectre d'action (antibactérien et antifongique) sont souvent décrits dans la littérature (**Thakur et al., 2007; Valanarasuet al., (2008 et 2009); Duraipandiyan et al., 2010; Aouiche et al., 2012**). Certains sont même actifs contre des champignons pathogènes pour l'homme et multirésistants aux antibiotiques (**Kumar et Kannabiran, 2010**) ou encore contre des larves d'insectes (**Valanarasu et al., 2010**). En Algérie, plusieurs souches de *Streptomyces* isolées à partir de sols, d'eau et d'écorces d'arbre sont montrées des activités antibactériennes et antifongiques intéressantes contre divers microorganismes pathogènes (**Boudemagh et al., 2005; Kitouni et al., 2005**).

IV.3. Cinétique de la croissance, du pH et de l'activité antibactérienne et antifongique de la souche *Streptomyces* AH08

IV.3.1. Résultats

La cinétique de production est suivie quotidiennement pendant 10 jours dans des milieux de culture synthétiques et semi synthétiques en l'additionnant 3 sources de carbone : amidon, dextrine et glycérol, les milieux sont: MS A, MS D, MS L, MSS A, MSS D, MSS L.

Ce suivi consiste à évaluer les variations de l'activité antimicrobienne, de la croissance et du pH durant la période de la fermentation.

IV.3.1.1. Cinétique de croissance et du pH

D'après les résultats de la cinétique, le milieu qui est considéré comme étant le meilleur milieu c'est le milieu MSA (Milieu synthétique avec l'amidon comme source de carbone), les résultats de la cinétique de croissance, du pH et de l'activité antimicrobienne sur le milieu MSA sont illustrés dans la **figure 18**.

Le pH initial de 7,12 évolue lentement pendant la fermentation pour atteindre 7,53 le 10^{ème} jour (**figure 18a**).

La courbe de croissance (**figure 18b**) débute directement par une phase exponentielle et atteindre son maximum le 3^{ème} jour, à partir de ce jour-là (3^{ème} jour) la phase de déclin se commence jusqu'à le 7^{ème} jour où la croissance se stabilise pendant un jour avant une légère reprise de croissance le 8^{ème} jour (croissance cryptique).

IV.3.1.2. Cinétique de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est mesurée par la méthode de diffusion de puits d'**Aszalos (1986) (figure 19)** contre 2 bactéries à Gram positif *Listeria monocytogenes* (ATCC13932), *Staphylococcus aureus* (MRSA639c), une bactérie à Gram négative *Escherichia coli* (ATCC8739), et 4 champignons : *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus ochraceus*, *Fusarium culmorum*, *Umbelopsis ramanniana*.

La courbe de l'activité antibactérienne (**figure 18c**) révèle que la production des antibiotiques débute dès le premier jour (la phase exponentielle de croissance) et atteint son maximum le 5^{ème} jour (durant la phase de déclin).

L'activité contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA639c) a atteint une valeur minimale de 25 mm de diamètre de la zone d'inhibition dans le 1^{er} jour et une valeur maximale de 45 mm dans le 5^{ème} jour. Alors que *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) a marquée une valeur minimale de 25 mm dans le 1^{er} jour et une valeur

maximale de 40 mm dans le 5^{ème} jour et pour *Escherichia coli* (ATCC8739) les valeurs de l'activité sont comprises entre 22 mm dans le 1^{er} jour et 40 mm dans le 5^{ème} jour.

Cependant, l'activité antifongique (**figure 18d**) commence plus tardivement par rapport à l'activité antibactérienne (à partir de la 2^{ème} contre Ur, Ac, et Ao ou le 3^{ème} jour contre Fc) et les valeurs de l'activité antifongique sont entre 24 mm le 3^{ème} jour et 13 mm le 8^{ème} jour contre *Umbelopsis ramanniana*, 26 mm le 5^{ème} jour et 17 mm dans les 3 derniers jours contre *Aspergillus carbonarius*, 26 mm le 7^{ème} jour et 16 mm le 8^{ème} jour contre *Aspergillus ochraceus* et contre *Fusarium culmorum* les diamètres des zones d'inhibition sont compris entre 24 mm le 6^{ème} jour et 17 mm le 4^{ème} jour.

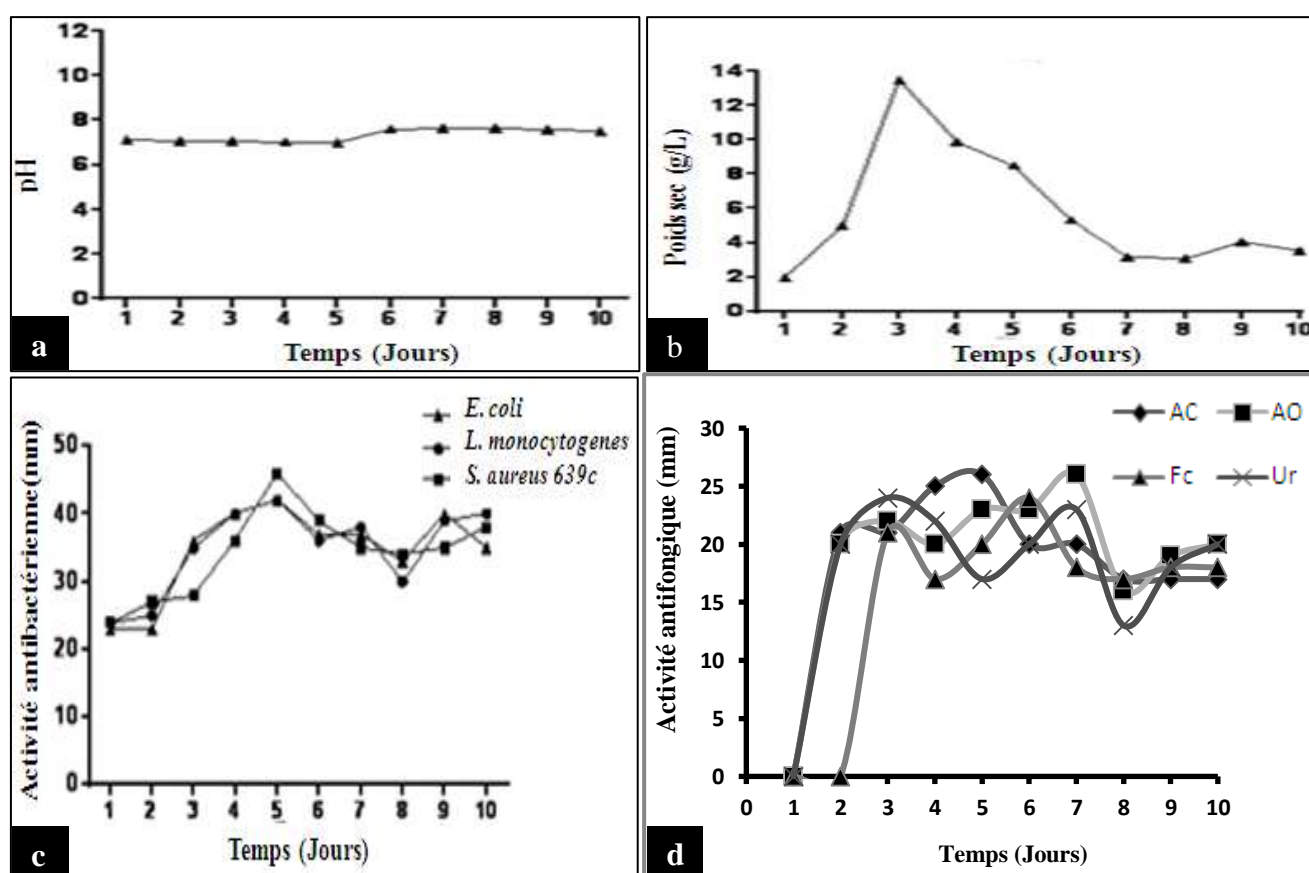


Figure 18. Cinétique du pH, du poids sec et de l'activité antibactérienne contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA639c) (■), *Escherichia coli* (ATCC8739) (▲) et *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) (●) et de l'activité antifongique contre *Aspergillus carbonarius* (Ac) (●), *Aspergillus ochraceus* (Ao) (■), *Fusarium culmorum* (Fc) (▲) et *Umbelopsis ramanniana* (Ur) (×) dans le milieu MSA.



Figure 19. Activité antibactérienne de la souche *Streptomyces* sp. AH08 contre *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) (LM) et *Escherichia coli* (ATCC8739) par la méthode de diffusion de puits.

IV.3.2. Discussion

Les cinétiques de croissance, du pH et de production des antibiotiques par la souche *Streptomyces* AH08 d'actinobactéries ont été menées en conditions liquides et en agitation en utilisant les milieux synthétiques et semi-synthétiques avec les 3 sources de carbone : MSA, MSL, MSD, MSSA, MSSL, MSSD.

IV.3.2.1. Cinétique de croissance

L'utilisation de différents milieux de culture, c'était pour but de rechercher le milieu de culture permettant une production optimale. Plusieurs études ont montré que la recherche d'un milieu de culture approprié est fondamentale dans la production des métabolites bioactifs (Ababutain *et al.*, 2013; Mander *et al.*, 2013; Souagui *et al.*, 2015).

Les résultats de la cinétique nous ont permis de montrer que le taux de la biomasse et la production des molécules bioactives est en relation avec la source de carbone ajoutée dans le milieu de culture puisque les valeurs obtenues se diffèrent d'un milieu à un autre, ce qui est en corrélation avec les résultats de **Rafieenia (2013)** qui a signalé que les sources de carbone comme l'amidon, la dextrine et le glycérol sont généralement les meilleures sources de carbone pour la production d'antibiotiques par les espèces de *Streptomyces* car ils maintiennent un taux de croissance lent qui est approprié pour la production d'antibiotiques. Dans notre étude, on a utilisé ces 3 sources de carbone et le choix s'est porté sur l'amidon qui a assuré à la fois une bonne croissance et une meilleure activité antimicrobienne de la souche *Streptomyces* sp. AH08.

Les résultats de l'amidon comme étant la meilleure source de carbone lors de la cinétique rejoignent ceux obtenus par l'étude de **Tata (2020)** réalisée sur la production

d'antibiotiques par *Streptomyces* sp. PAL114 en fonction des sources d'azote et de carbone et celle signalés par **Elattal et al. (2011)** qui ont étudié la production de métabolites antifongiques par une souche de *Streptomyces noursei*. Ainsi que (**Lebrihi et al., 1988; Lounès et al., 1996; Ababutain et al., 2013; Siddique et al., 2013**) ont aussi signalé que les sources de carbone lentement assimilées comme les polysaccharides (tels que l'amidon et la dextrine) permettent d'avoir un apport de carbone de façon lente mais continue et donc de meilleurs rendements de production d'antibiotiques.

Les expérimentations de **Tata (2020)** sur la production des antibiotiques par la souche *Streptomyces* sp. PAL114 sont toutes réalisées dans un milieu MS liquide ainsi que l'étude de **Laasami (2015)** sur la production par la souche *Saccharothrix tamanrassetensis*, ce qui concorde avec notre choix du milieu MS comme meilleur milieu de production.

La courbe de croissance est caractérisée par l'absence de la phase de latence (correspond au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture) qui peut être expliquée par le fait que les pré-cultures soient menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles étaient prises en phase exponentielle de croissance et en ce qui a trait à l'absence de la phase stationnaire, est un phénomène qui a déjà été observé plusieurs fois chez les actinobactéries (**Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007; Aouiche, 2013; Bouali et al., 2017**). Une croissance additive (croissance cryptique) est observée après la phase de déclin (entre J8 et J10). Cette croissance est signalée chez plusieurs microorganismes, notamment les entérobactéries (**Prescott et al., 2002**) ou encore chez quelques souches de *Streptomyces* (**Driche, 2010; Toumatia, 2010**). Cette croissance cryptique s'explique par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin.

IV.3.2.2. Cinétique du pH

Le suivi des variations du pH durant la période de la fermentation révèle que le maximum de production est atteint à un pH neutre à légèrement basique de 7,20 résulte de la dégradation de l'amidon (complexe) en simples sources de carbone et aussi la basification du milieu est en relation avec l'antibiotique sécrété qui a un pH basique. Ce résultat est en corrélation avec celle obtenue par **Boubetra (2013)** et **Laasami (2015)** et par des travaux d'optimisation de la production des antibiotiques, où l'activité est mesurée à différents pH réalisés par (**Hata et al., 1971; Larpent et Sanglier, 1989; Larpent-Gourgau et Sanglier, 1992; Jain et al., 2011**) ils ont trouvé que la production sera maximale à un pH basique. Ainsi

que (Larpent et Sanglier, 1989; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992) ont aussi signalés qu'en général la production des antibiotiques est optimale à un pH légèrement basique.

IV.3.2.3. Cinétique de l'activité antimicrobienne

L'activité a été mise en évidence par la méthode de diffusion de puits. La souche *Streptomyces sp.* AH08 est marquée comme active contre tous les germes cibles testés. La plus grande activité est dirigée contre les bactéries, plus spécifiquement les bactéries à Gram positif vu que *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA639c) a atteint une valeur minimale de 25 mm dans le 1^{er} jour et une valeur maximale de 45 mm dans le 5^{ème} jour. *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) a marquée une valeur minimale de 25 mm dans le 1^{er} jour et une valeur maximale de 40 mm dans le 5^{ème} jour et pour *Escherichia coli* (ATCC8739) qui est une bactérie à gram négatif, l'activité est légèrement moindre par rapport à l'activité contre les bactéries à gram positif, l'activité est estimée entre 22 mm dans le 1^{er} jour et 40 mm dans le 5^{ème} jour (**figure 18c**), et pour les autres germes fongiques l'activité est moins intense que l'activité antibactérienne où ils ont marqué des valeurs maximales de 24 mm dans le 3^{ème} jour pour *Umbelopsis ramanniana*, 26 mm dans le 5^{ème} jour pour *Aspergillus carbonarius*, 24 mm dans le 6^{ème} jour pour *Fusarium culmorum* et une valeur maximale de 26 mm dans le 7^{ème} jour est marquée contre *Aspergillus ochraceus* (**figure 18d**).

Les résultats de la cinétique de l'activité antimicrobienne ont décelé que la souche AH08 est douée d'une activité antibactérienne et antifongique importante sur le milieu MSA.

La production des antibiotiques sur le milieu MSA commence dans la phase exponentielle (dès les premiers jours), le meilleur jour de production (le 5^{ème} jour) et les maxima de production sont notés durant la phase de déclin (entre J3 et J7 et la deuxième phase de déclin de J9 à J10), ce résultat est mentionné par (Zitouni, 2005; Badji, 2006) qui ont déclaré que généralement, la synthèse des métabolites secondaires par les micro-organismes producteurs se fait durant les phases de ralentissement et stationnaire de croissance, mais dans le cas des actinobactéries et spécialement les *Streptomyces*, la synthèse de ces métabolites peut avoir lieu durant les phases: exponentielle, stationnaire et de déclin. Aussi Aouiche (2013) a déclaré que durant les phases de déclin, les cellules se lysent et libèrent les quantités d'antibiotiques non encore sécrétés.

Les cinétiques des activités antibactériennes présentent plusieurs maxima, cela suggère la production de plusieurs antibiotiques ou complexes d'antibiotiques qui seraient soit des dérivés proches soit des groupes d'antibiotiques différents ou encore à spectres d'activité probablement différents (Toumatia, 2015).

IV.4. Antibiographie

IV.4.1. Résultats

Après l'extraction des antibiotiques par des solvants organiques, les extraits vont subir à un test d'antibiographie par la méthode des disques de papier pour tester leur activité contre les germes-cibles: *Staphylococcus aureus* (MRSA639c), *Escherichia coli* (ATCC8739) et *Listeria monocytogenes* (ATCC13932), **figure 20** et les diamètres des zones d'inhibition sont mentionnés dans le **tableau 7**.

Les résultats de l'antibiographie des extraits organiques ont montré que les quatre solvants donne une activité contre les germes cibles de cette étude avec de meilleurs résultats pour le *n*-butanol avec des zones d'inhibition atteint 35 mm contre Sa, 34 mm contre *E. coli* et 38 mm contre Lm, l'acétate d'éthyle 27 mm contre Sa, 30 mm contre *E.coli* et 30 mm contre Lm, le dichlorométhane 26 mm contre Sa et *E.coli*, 28 mm contre Lm et à un degré moindre le *n*-hexane 14 mm contre Sa, 15 mm contre E.coli et 18 mm contre Lm.

Le choix du meilleur solvant d'extraction de l'activité antibiotique repose sur deux paramètres:

- ✓ Le solvant doit extraire une bonne activité antimicrobienne.
- ✓ Le solvant doit extraire le moins d'impuretés possibles, comme c'est le cas pour le dichlorométhane (connu pour cette propriété), contrairement au *n*-butanol et à un degré moindre l'acétate d'éthyle, et ce, pour faciliter le processus de purification par HPLC.

Alors, le dichlorométhane a été retenu comme solvant d'extraction du filtrat de culture, même si son pouvoir d'extraction est légèrement moindre que celui des deux autres solvants. Dans ce but, une double extraction avec ce solvant peut être suffisante pour extraire tous les antibiotiques (**Aouiche, 2013**).



Figure 20. Activités antibactériennes des extraits de dichlorométhane (D), n-hexane (H), acétate d'éthyle (E.A) et n-butanol (B) contre *Escherichia coli* (ATCC 8739) et *Listeria monocytogenes* (ATCC 13932) par la méthode du disque papier.

Tableau 7. Activité antimicrobienne de *Streptomyces sp.* AH08 contre *Staphylococcus aureus* (MRSA639c), *Escherichia coli* (ATCC8739) et *Listeria monocytogenes* (ATCC13932) en utilisant différents solvants organiques.

Microorganisme-cible	Zone d'inhibition (mm) obtenue en utilisant différents solvants			
	<i>n</i> -butanol	acétate d'éthyle	dichlorométhane	<i>n</i> -hexane
<i>S. aureus</i> (MRSA 639c)	35	27	26	14
<i>E. coli</i> (ATCC 8739)	34	30	26	15
<i>L. monocytogenes</i> (ATCC 13932)	38	30	28	18

IV.4.2. Discussion

L'extraction des antibiotiques est réalisée au jour de la production optimale en se basant sur les résultats de la cinétique de production (Milieu MSA, J5) et le test de l'antibiographie des extraits est réalisé par la méthode de disque papier contre *Staphylococcus aureus* (MRSA639c), *Escherichia coli* (ATCC8739) et *Listeria monocytogenes* (ATCC13932).

Le **tableau 7** montre que les 3 solvants: le *n*-butanol, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane ont donné des résultats intéressants et plus au moins proches, alors que le *n*-hexane a montré une activité assez faible par rapport à ces trois solvants. Le *n*-butanol qui a l'activité la plus importante, est connu pour son pouvoir d'extraction élevé, mais l'inconvenant c'est qu'il extrait non seulement les antibiotiques mais aussi beaucoup d'impuretés non actives qui risquent de gêner les purifications ultérieures (notamment par HPLC), comme l'ont d'ailleurs constaté **Zitouni (2005)**, **Badji (2006)** et **Boudjella (2007)**. C'est pour cela que nous avons choisi le dichlorométhane qui a toujours donné de bons résultats (peu d'impuretés) pour extraire les antibiotiques, comme l'ont souligné également

Zitouni (2005) et **Lamari (2006)** pour *Saccharothrix sp.* SA103 et *Saccharothrix algeriensis*, et a été aussi confirmé par **Aouiche (2013)**, et avec une activité antimicrobienne traduit par des zones d'inhibition de 26 mm de diamètre contre *S. aureus* (MRSA639c), 26 mm contre *E. coli* (ATCC8739) et 28 mm contre *L. monocytogenes* (ATCC13932).

Le choix du meilleur solvant d'extraction n'est qu'une première étape dans l'extraction des antibiotiques qui est suivie par l'analyse des antibiotiques par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) qui va être poursuivie sur les extraits au dichlorométhane des surnageants de culture de la souche AH08 issus du milieu MSA pour la détection des fractions actives, cela ouvre les perspectives pour une étude approfondie dans ce cadre.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Les travaux réalisés au niveau du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger, et qui ont ciblé l'étude des actinobactéries du point de vue taxonomique et de la production des antibiotiques, ont conduit à étudier la cinétique de la production et aussi l'activité antibactérienne, antifongique, antagoniste des souches et l'extraction de ces molécules bioactives secrétées.

Le présent travail rentre dans ce cadre est vise à étudier la position taxonomique de la souche AH08 de *Streptomyces* isolée à partir d'un échantillon de sol saharien prélevé de la région de Tamanrasset et sa capacité de produire des antibiotiques. Nous nous sommes intéressés aux facteurs nutritionnels influençant cette production, à savoir la source de carbone ajouté dans les milieux synthétiques et semi synthétiques utilisés dans cette étude. De plus l'évaluation de l'activité antibactérienne et antagoniste contre des germes-cibles pathogènes et multirésistants.

Dans un premier temps, une étude taxonomique polyphasique a été effectuée pour la souche *Streptomyces* AH08, basée sur des études morphologique, physiologique (basée sur l'utilisation de plusieurs composés organiques et moléculaire (séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S suivi par une étude phylogénétique approfondie).

Les résultats de l'étude taxonomique en se basant sur les caractéristiques morphologiques et physiologiques ont permis d'assigner la souche AH08 au genre *Streptomyces*. Les données phylogénétiques présentées dans un arbre phylogénique ont également permis de rattacher notre souche au genre *Streptomyces*, avec une similarité de 99,57 % avec la souche *Streptomyces djakartensis* NBRC15409^T(AB184657).

Les potentialités antagonistes de la souche AH08 ont été évaluées sur milieu ISP 2 et des milieux synthétiques et semi-synthétiques avec les sources de carbone vis-à-vis de plusieurs germes-cibles dont la plupart sont pathogènes ou toxigènes pour l'homme ou encore phytopathogènes. La souche AH08 montre un potentiel antagoniste remarquable contre les bactéries comparativement aux champignons.

L'étude de l'influence des sources de carbone sur la production des antibiotiques par la souche *Streptomyces* AH08 à travers des cinétiques de production, de pH et la croissance dans des conditions expérimentales identiques, dont le but, est de rechercher un milieu de culture favorable à la production et assure à la fois une meilleure activité antimicrobienne de la souche AH08.

Le milieu MSA (milieu synthétique qui a comme source de carbone l'amidon) a été choisi comme meilleur milieu de production avec un optimum au 5^{ème} jour de la fermentation à un pH basique et une activité antibactérienne et antifongique importante contre tous les germes cible, cette production est obtenue durant les phases: exponentielle et de déclin de la croissance avec la possibilité de production des plusieurs antibiotiques ou complexes d'antibiotiques.

En ce qui concerne l'extraction des antibiotiques et le test d'antibiographie, le dichlorométhane est choisi comme étant le meilleur solvant d'extraction.

Nos résultats encouragent la poursuite des études sur les actinobactéries est spécialement sur le genre *Streptomyces* pour bien exploiter leur potentiel ainsi que sur l'évaluation de leurs activités antibactériennes et leurs propriétés antagonistes.

Comme perspectives, il serait intéressant :

- De réaliser de l'hybridation ADN-ADN pour la souche AH08 avec la souche la plus proche afin de confirmer leur position taxonomique.
- D'extraire et de purifier les antibiotiques de cette souche, en déterminant leurs structures chimiques par RMN et leurs concentrations minimales inhibitrices CMI contre des germes pathogènes.
- De réaliser des tests de toxicité des antibiotiques sécrétés vis-à-vis des cellules animales, afin de mieux évaluer leur intérêt dans le domaine médical ou vétérinaire.
- De tester ses potentialités en biocontrôle et son effet PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria).

Références bibliographiques

Références bibliographiques

A

Ababutain, I. M., Zeinab, K., Abdul, A. et 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 p.

Aktas G. (2020). In vitro efficacy of vancomycin combined with fosfomycin against Vancomycin-Resistant Enterococci strains. Pak J Med Sci.;36(2): 281-285 p.

Alexander M., (1977). Introduction to Soil Microbiology. Wiley, New York. 480 p.

Amanullah A., Justen P., Davies A., Paul G.C., Nienow A. W. et Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. Biochem. Eng. J. 5 (2) : 109-114 p.

Anderson Annaliesa S. et Wellington Elizabeth M.H. (2001). The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. 51,797–814 p.

Aouiche A. (2013). Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'Homme. Thèse de Doctorat en Microbiologie. L'école normale supérieure de Kouba-Alger. 11, 95, 109, 110 p.

Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F. et Lebrihi A. (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces sp.* PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. Journal De Mycologie Médicale. 1-5 p.

Aszalos, A. A. (Ed.). (1986). Modern analysis of antibiotics. Drugs and the pharmaceutical sciences. New York: Dekker.

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 *Nonomuraea*.

Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.

Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N., (2005). Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *Journal de Mycologie Médicale*, 15: 211-219 p.

Barka EA, Vatsa P, Sanchez L, Gaveau-Vaillant N, Jacquard C, Klenk H-P Clément C, Ouhdouch Y et van Wezel GP (2016). Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* 80: 1–43 p.

Ben Ameer Mehdi R., Sioud S., Fourati Ben Fguira L., Bejar S. et Mellouli L. (2006). Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* sp. TN97 strain. *Proc Biochem*. 41: 1506-1513 p.

Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.-M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D. et al. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature*, vol417. 141-142.

Bergey's manual of Systematic Bacteriology (2012). Second Edition. Volume 5. The Actinobacteria, Part A. Michael Goodfellow, Peter Kämpfer, Hans-Jürgen Busse, Martha E. Trujillo, Ken-ichiro Suzuki, Wolfgang Ludwig. Springer New York Dordrecht Heidelberg London. 1455-1477 p.

Blaskovich Mark A.T., Hansford Karl A., Butler Mark S., Jia ZhiGuang, Mark Alan E. et Cooper Matthew A. (2018). Developments in Glycopeptide Antibiotics. *American Chemical Society Infect. Dis.* 2018, 4, 715–735 p.

Bouali H., Hamza K., Bouras N., Aouiche A., Meklat A., Mokrane S., Hamza K. et Sabaou N. (2017). Effet de milieux de culture sur la croissance et la production de chloramphenicol chez deux souches de *Saccharothrix* sp. PAL 54 et PAL 42 isolées d'un sol de la palmeraie de Ghardaïa. *Algerian journal of arid environment* vol. 7, n°1. 71-83 p.

Boubetra D. (2013). Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198. Thèse de Doctorat. Ecole nationale supérieure agronomique. El-Harrach. 154 p.

Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P., et Sabaou N., (2013). *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 63: 549-553 p.

Boudemagh A., Kitouni M., Boughachiche F., Hamdiken H., Oulmi L., Reghioua S., et al. (2005). Isolation and molecular identification of actinomycete microflora, of some saharian soils of south-east Algeria (Biskra, El-Oued and Ourgla) study of antifungal activity of isolated strains. *J Mycol Med*;15:39-44 p.

Boudjelal F., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., et Sabaou N. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of two novel halophilic *Saccharomonospora* strains isolated in Algerian Sahara soils. *Ann. Microbiol.*, 61: 299-305 p.

Boudjella H (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. 188 p.

Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. et Sabaou N., (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharansoil. *Microbiological Research*, 161: 288-298 p.

Boudjella H., Zitouni A., Coppel C., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. et Lebrihi A. (2010). Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *Journal of Antibiotics*, 63: 709-711 p.

C

Cambau E. et Guillard T. (2012). Antibactériens agissant sur la synthèse et la conformation des acides nucléiques. *Rev. sci. tech. Off. int. Epiz.*, 31 (1). 72-73 p.

Cardoso Tabata P., Sà Larissa A. de, Bury Priscila dos S., Chavez-Pacheco Sair M., Dias Marcio V.B. (2017). Cloning, expression, purification and biophysical analysis of two putative halogenases from the glycopeptide A47,934 gene cluster of *Streptomyces toyocaensis*. *Protein Expression and Purification* 132. Elsevier Inc. 9-18 p.

Carlos F. et Amábile-Cuevas (2016). Antibiotics and Antibiotic Resistance in the Environment. CRC Press. 12-13 p.

Chaves J.V., Ojeda Cinthya Paola O., Reis da Silva I. et Emerson de Lima Procopio R. (2018). Identification and Phylogeny of *Streptomyces* Based on Gene Sequences. *Research Journal of Microbiology*, 13:13-20 p.

D

Doull Janice L. et Vining Leo C. (1990). Nutritional control of actinorhodin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol* 32. Springer-Verlag. 449-454 p.

Driche E (2010). Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS Kouba, Alger.

Duraipandiyan V, Sasi AH, Islam VIH, Valanarasu M. et Ignacimuthu S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J Mycol Med*;20:15-20.

Dworkin M., Falkow S., Rosberg E., Schleifer K-H. et Stackebrandt E. (2006). The Prokaryotes, 3^{ème} édition, Volume 2, A Handbook on the Biology of Bacteria : Archea, Bacteria : Firmicutes, Actinomycetes, édition Springer, USA.

E

Elattal, N. A., Hamdy, A. A., Ali, A. E. et Amin, M. A. (2011). "Nystatin Production by a Local *Streptomyces* sp. Isolated from Egyptian Soil." *J. Pharm. Biomed. Sci.* 1(6): 128-136 p.

Ettlinger, L., Corbaz, R., et Hutter, R. (1958). "Zur Systematik der Actinomyceten. 4. Eine Arteneinteilung der Gattung *Streptomyces* Waksman and Henrici." *Arch. Mikrobiol.* 31:326-358 p.

F

Falagas ME, Vouloumanou EK, Samonis G. et Vardakas KZ. (2016). Fosfomycin. *Clin Microbiol Rev* 29: 321–347 p.

Fang Q., Maglangit F., Wu L., Ebel R., Kyeremeh K., Andersen Jeanette H., Annang F., Pérez-Moreno G., Reyes F. et Deng H. (2020). Signalling and Bioactive Metabolites from *Streptomyces* sp. RK44. *Molecules*. 1 p.

Felsenstein, J. (1981). Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.*, 17: 368–376 p.

Felsenstein, J. (1985). Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*, 39: 783 p.

Ferguson, E.V., A.C. Ward, J.J. Sanglier et M. Goodfellow (1997). Evaluation of *Streptomyces* species-groups by pyrolysis mass spectrometry. *Zentralbl. Bakteriologie*. 285: 169–181 p.

Fitch, W. M. (1977). On the problem of discovering the most parsimonious tree. *Am. Nat.*, 111: 223–257 p.

Fourati Ben Fguira L., Fotso S., Ben Ameer Mehdi R., Mellouli L. et Laatsch H. (2005). Purification and Structure Elucidation of Antifungal and Antibacterial Activities from a Newly Isolated *Streptomyces* sp. US80 strain. *Research in Microbiology*. 156 (3): 341–347.

Francis D. (2017). Antimicrobials from Microbes in S. Sugathan et al.(eds.), *Bioresources and Bioprocess in Biotechnology* vol 2. Springer Nature Singapore Pte Ltd. 294p.

G

Goodfellow, M. et A.G. O'Donnell (1993). Roots of bacterial systematics In *Handbook of New Bacterial Systematics* (edited by Goodfellow and O'Donnell). Academic Press, London. 3–56 p.

Goodfellow, M., C. Lonsdale, A.L. James et O.C. Macnamara (1987b). Rapid biochemical tests for the characterization of *streptomyces*. *FEMS Microbiol. Lett.* 43: 39–44p.

Gordon, R. E., Barnett, D. A., Handerhan, J. E. et Pang, C. H.-N. (1974). *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica*, and the nocardin Strain. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 24: 54–63 p.

Grace Yim. (2011). L'attaque des superbactéries: Résistance aux antibiotiques. *The Science Creative Quarterly*. Issue Six. Lapsus Nivium.

H

Hamed J. et Poorinmohammad N. (2017). The Cellular Structure of Actinobacteria in Biology and Biotechnology of Actinobacteria (Wink *et al.*, 2017). Springer International Publishing. 12 p.

Hamed J., Poorinmohammad N. et Papiran R. (2017a). Growth and Life Cycle of Actinobacteria in Biology and Biotechnology of Actinobacteria (Wink *et al.*, 2017). Springer International Publishing. 29-30 p.

Hamed J., Poorinmohammad N. et Wink J. (2017b). The Role of Actinobacteria in Biotechnology. in Biology and Biotechnology of Actinobacteria (Wink *et al.*, 2017). Springer International Publishing. 270-285 p.

Hamza K., Bouali H., Bouras N., Bouallala M., Badji B., Klenk H-P et Sabaou N. (2018). Effet des monosaccharides sur la croissance et la production de chloramphenicol chez deux souches de *Saccharothrix longispora* (pal 54 et pal 42) isolées d'un sol de la palmeraie de Ghardaïa. African Review of Science, Technology and Development V 03. 40 p.

Hasani A., Kariminik A. et Issazadeh K. (2014). Streptomycetes: Characteristics and Their Antimicrobial Activities. International journal of Advanced Biological and Biomedical Research. Volume 2, Issue 1. 63-75 p.

Hasavada S. H., Thumar J. T. et Singh S. P., (2006). Secretion of a potent antibiotic by salttolerant and alkaliphilic actinomycete *Streptomyces sannanensis* strain RJT-1. Current Science. vol 91(10). Pp : 1393-1397 p.

Hashemian S.M., Farhadi Z. et Farhadi T. (2019). Fosfomycin: the characteristics, activity, and use in critical care. Therapeutics and Clinical Risk Management: 15. 525–530 p.

Hata T., Omura S., Iwai Y., Ohno H., Takeshima H. et Yamaguchi N. (1971). - A new antibiotic kinamycin: fermentation, isolation, purification and properties. J. Antibiot., 24, 353-359 p.

Hayakawa M, Nonomura H (1984). HV agar, a new selective medium for isolation of soil actinomycetes. Annual Meeting of the Actinomycetologists, Osaka, Japon. 6 p.

Hayakawa M, Nonomura H (1987). Humic acid-vitaminagar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. J Ferm Technol 65:501–509 p.

Hodgson David A. (2002). Primary Metabolism and its Control in *Streptomyces*: A Most Unusual Group of Bacteria. *Advances in microbiol physiology* Vol 42. 52 p.

Hofheinz, W. et H. Grisebach (1965). Die Fettsäuren von *Streptomyces erythreus* und *Streptomyces halstedii*. *Z. Naturforsch.* 20B: 43 p.

Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Staley JT et Williams ST (1994). In: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9^{ème} édition, Williams and Wilkins editors, Baltimore. 816 p.

Hopwood D.A, Bibb M. J, Chater K. F, Kieser T, Bruton C.J, Kieser H.M, Lydiate D.J, Smith C. P, Ward J. M et Schremph H. (1985). *Genetic Manipulation of Streptomyces : A Laboratory Manuel*. Norwich, UK : John Innes Foundation.

Horbal L. et Luzhetskyy A. (2017). The Genetic System of Actinobacteria in Biology and Biotechnology of Actinobacteria (Wink *et al.*, 2017). Springer International Publishing. 80-85p.

Huber, G., Wallaheusser, K., Fries, L., Steigler, A. et Weidenmueller, U. H. (1962). Niddamycin, ein neues Makrolid-Antibioticum. *Arzneim Forsch*, 12, 1191-1195 p.

Hughes D. et Andersson D.I. (2001). *Antibiotic Development and Resistance*. CRC Press. 199 p.

J

Jain R., Zaidi K.U., Parveen N. et Saxena A. (2011). Optimization of Cultural Conditions for the Production of Antibiotic by *Streptomyces sp.* VRY-1. *Recent Research in Science and Technol.*, 3, 81-87 p.

Jukes, T. H. et Cantor, C. R. (1969). Evolution of Protein Molecules. In *Mamm. Protein Metab.*, Elsevier. 21–132 p.

K

Kämpfer P. (2006). The family *Streptomycetaceae*, Part I: Taxonomy. In *The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria*, 3rd edn, vol. 3, Archaea, Bacteria, Firmicutes, Actinomycetes (edited by Dwor-kin, Falkow, Rosenberg, Schleifer and Stackebrandt). Springer, New York. 538–604 p.

Kämpfer P., Kroppenstedt, R. M. et Dott, W. (1991). A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. J GenMicrobiol 137,1831-1891 p.

Kämpfer P., Rückert C., Blom J., Goesmann A., Wink J., Kalinowski J. et Glaese S.P. (2017). *Streptomyces phaeopurpureus* Shinobu 1957 (Approved Lists 1980) and *Streptomyces griseorubiginosus* (Ryabovaand Preobrazhenskaya 1957) Pridham et al. 1958 (Approved Lists 1980) are heterotypic subjective synonyms. Int J Syst Evol Microbiol ; 67:3111–3116 p.

Khebizi N., Boudjella H., Bijani C., Bouras N., Klenk H.-P., Pont F., Mathieu F. et Sabaou N. (2017). Oligomycins A and E, major bioactive secondary metabolites produced by *Streptomyces* sp. strain HG29 isolated from a Saharan soil. Journal De Mycologie Médicale. Elsevier. 6 p.

Kim, O.-S., Cho, Y.-J., Lee, K., Yoon, S.-H., Kim, M., Na, H., Park, S.-C., Jeon, Y. S., Lee, J.-H. et 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 p.

Kitouni M, Boudemagh A ,Oulmi L, Reghioua S, Boughachiche F, Zerizer H, et al. (2005). Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. J Mycol Med;15:45-51 p.

Korn-Wendisch, F. et J. Schneider (1992). Phage typing: a useful tool in actinomycete systematics. Gene 115: 243–247 p.

Kroppenstedt, R.M. (1992). The genus *Nocardiopsis*. In The Prokaryotes: a Handbook on the Biology of Bacteria: Ecophysiology, Isolation, Identification, Applications, 2nd edn (edited by Balows, Trüper, Dworkin, Harder and Schleifer). Springer, New York. 1139–1156.

Kumar S, Kannabiran K. (2010). Antifungal activity of *Streptomyces* VITSVK5spp. against drug resistant *Aspergillus* clinical isolates from pulmonary tuberculosis patients. J Mycol Med; 20:101-7 p.

L

Laasami A. (2015). Effet de quelques sources nutritionnelles sur la production d'antibiotiques par la souche sa198 de *Saccharothrix* sp. En milieu de culture semi-synthétique. Mémoire de Magister. Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger. 49 p.

Labeda D. P. (1992) DNA-DNA hybridization in the systematics of *Streptomyces*. Gene. 115: 249-253 p.

Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot B., Vannanneyt M., Swings J., Kim S.-B., Liu Z., Chun J., Tamura T., Nishii T., Tsuji K., Yamaguchi Y., Tase A., Takahashi M., Sakane T., Suzuki K.I., Hatano K. (2012). Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. Springer. Antonie van Leeuwenhoek. 101:73-104 p

Lamari L (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 186 p.

Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. et Tillequin F., (2002a). New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. Journal of Antibiotics, 55: 696-701 p.

Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. et Tillequin F., (2002b). New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. Journal of Antibiotics, 55: 702-707 p.

Langham C. D., Williams S. T., Sneath P. H. A. et Mortimer A. M. (1989). New probability matrices for identification of *Streptomyces*. J Gen Microbiol. 135: 121-133 p.

Lanoot, B., M. Vannanneyt, I. Cleenwerck, L. Wang, W. Li, Z. Liu et J. Swings (2002). The search for synonyms among streptomycetes by using SDS-PAGE of whole-cell proteins. Emendation of the species *Streptomyces aurantiacus*, *Streptomyces cacaoi* subsp. *cacaoi*, *Streptomyces caeruleus* and *Streptomyces violaceus*. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 52: 823–829 p.

Larpent J.P., Sanglier J.J. (1989). - Biotechnologie des antibiotiques. Masson éditeurs. Paris. France.

Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1992). - Biotechnologie. Principes et méthodes. Doin éditeurs. Paris. France.

Law JW-F, SerH-L, Duangjai A, SaokaewS, BukhariSI, KhanTM, MutalibN-SA, ChanK-G et GohB-HandLeeL-H (2017). *Streptomyces colonosanans* sp.nov., A Novel Actinobacterium Isolated from Malaysia Mangrove Soil Exhibiting Antioxidative Activity and Cytotoxic Potential against Human Colon Cancer Cell Lines.Front.Microbiol.Volume 8 Article 877. 2 p.

Lebrihi, A., Lefebvre, G. et Germain, P. (1988). "Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*." Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 44-51 p.

Lechevalier H.A. et Lechevalier M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales, dans: Starr M.P., Stolp H., Truper H.G., Ballows A. et Schlegel H.G. The prokaryote (volume 2). Springer-Verlag Edition Berlin : 1915-1922 p.

Lechevalier MP, De-bievre C et Lechevalier HA (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. Biochem Syst Ecol 5:249–260 p.

Lechevalier, H.A. et M.P. Lechevalier (1970a). A critical evaluation of the genera of aerobic actinomycetes. In The Actinomycetales (édité par Prauser). Gustav Fischer Verlag, Jena. 395-405 p.

Lechevalier, M.P. (1977). Lipids in bacterial taxonomy - a taxonomist's view. CRC Crit. Rev. Microbiol. 5: 109-210 p.

Lechevalier, M.P. et H.A. Lechevalier (1970c). Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actino-mycetes. In The Actinomycetales (edited by Prauser). Gustav Fischer Verlag, Jena, pp. 311-316 p.

Lechevalier, M.P. et Lechevalier H.A. (1970b). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. Int. J. Syst. Bacteriol. 20: 435-443 p.

Liu, D., Coloe, S., Baird, R. et Pedersen, J. (2000). Rapid mini-preparation of fungal DNA for PCR. J. Clin. Microbiol., 38: 471 p.

Lo Grasso L., Martino Delia C. et Alduina R. (2016). Production of Antibacterial Compounds from Actinomycetes. *in* Actinobacteria. Basics and Biotechnological Applications Edited by Dharumadurai Dhanasekaran and Yi Jiang. 178 p.

Lounès, A., Lebrihi, A., Benslimane, C., Lefebvre, G. et Germain, P. (1996). "Effect of nitrogen/carbon ratio on the specific production rate of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*." *Process Biochem.* 31: 13-20 p.

M

Manchester, L., B. Pot, K. Kersters et M. et Goodfellow (1990). Classification of *Streptomyces* and *Streptoverticillium* species by numerical- analysis of electrophoretic protein-patterns. *Syst. Appl. Microbiol.* 13: 333–337 p.

Mander, P., Yun, H. C., Jeong, H. S., Baek, H. N., Seung, S. C., Hyo, J. L. et Jin, C. Y. (2013). "Statistical optimization of a multivariate fermentation process for enhancing antibiotic activity of *Streptomyces sp.* CS392." *Arch. Pharm. Res.* 36: 973-980 p.

Manteca, A., J. Sanchez, Jung, H. R., Schwammle, V., et Jensen, o. N. (2010). Quantitative proteomics analysis of *Streptomyces coelicolor* developement demonstretes that Onser of secondary metabolism coincides with hypha differentiation. *Moleculair et cellular protromics*,9 (7),1423-1436 p.

Marchal, N. et Bourdon, J. L. (1973). Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Doin (Eds), Paris, 179 p.

Marchal, N., Bourdon, J. L. et Richard, C. (1987). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin Press, Paris, France.67-122 p.

Meklat A. (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat. Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger. 125-127 p.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. et Sabaou N., (2013). *Actinopolyspora righensis sp. nov.*, a novel halophilic actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *Antonie van Leeuwenhoek*.

Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. et Sabaou N., (2012). *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil. *Extremophiles*, 16: 771-776 p.

Mellouli L., Ben Ameur-Mehdi R., Sioud S., Salem M. et Bejar S. (2003) Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a new isolated *Streptomyces* sp. US24 strain. *Research in Microbiology* 154: 345-352 p.

Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. et Lebrihi A., (2010). Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *Journal of Natural Products*, 73, 1164–1166 p.

Mohr K I (2016). History of antibiotics research. *Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer International Publishing AG. Vol : 398. 237–272 p.

Mordarska H., Cebrat S. et Beach B. (1978). Differentiation of Nocardioform Actinomycetes by Lysozyme Sensitivity. *Journal of General Microbiology*, 109. 381-384 p.

Murray P.R. (2018). Basic medical microbiology. Elsevier. 184 p.

N

Namil L., Woori K., Soonkyu H., Yongjae L., Suhyung C., Bernhard P. et Byung-Kwan C. (2020). Thirty complete *Streptomyces* genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Scientific Data*. 7:55 p.

Nonomura, H. (1974). Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in ISP. *J Ferment Technol* 52, 78–92 p.

O

Ochi, K. (1989). Heterogeneity of ribosomal proteins among *Streptomyces* species and its application to identification. *J. Gen. Microbiol.* 135: 2635–2642 p.

Ochi, K. (1992). Polyacrylamide gel electrophoresis analysis of ribosomal protein: a new approach for actinomycete taxonomy. *Gene* 115: 261–265 p.

Ochi, K. (1995). A taxonomic study of the genus *Streptomyces* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 45: 507–514 p.

P

Park M., Sutherland John B. et Rafii F. (2020). β -Lactam resistance development affects binding of penicillin-binding proteins (PBPs) of *Clostridium perfringens* to the fluorescent penicillin, BOCILLIN FL, Anaerobe. Elsevier Ltd. 3 p.

Patel J.J. et Brown. M.N. (1969). Interaction of azotobacter with rhizosphere and root surface microflora. Plant and soil. 31:271-281 p.

Peng X., Cao J., Xie B., Duan M. et Zhao J. (2019). Evaluation of degradation behavior over tetracycline hydrochloride by microbial electrochemical technology: Performance, kinetics, and microbial communities. Ecotoxicology and Environmental Safety 188. Elsevier Inc. 1-2 p.

Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H. et Fiedler, H. (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. J. Biotechnol., 80: 135–142 p.

Preobrazhenskaya T. P. et Ryabova I. D. In: Gauze, G. F., Preobrazhenskaia T. P., Kudrina E. C., Blinov N. O., Riabova I. D., et Sveshnikova M. A. (1986). Problems of classification of actinomycetes-antagonists. Government publishing house of medical literature, Medgiz, Moscow, USSR, 391-398 p

Prescott L. M., Harley J. P., Klein D. A., Bacq-Calberg C. M. et Dusart J. (2002). Microbiologie, De Boeck University. 1147 p.

Pucci Michael J. et Dougherty Thomas J. (2008). A Method to Assay Penicillin-Binding Proteins in Methods in molecular medicine. Vol.142: New Antibiotic Targets. Edited by W. Scott Champney. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey 07512. 131-132 p.

R

Rafieenia, R. (2013). "Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in *Streptomycetes*." Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences 3: 810-821 p.

Rapilly F. (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann Epiphyties 19, numéro hors série.

Ridell, M., G. Wallerström et S.T. Williams (1986). Immunodiffusion analyses of phenetically defined strains of *Streptomyces*, *Streptovorticillium* and *Nocardiopsis*. Syst. Appl. Microbiol. 8: 24–27 p.

S

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A, Lamari L., Bennadji H., Lefebvre G. et Germain P. (1998). - Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes rares producteurs d'antibiotiques. Sécheresse, 9: 147-153 p.

Saddler, G.S., A.G. O'Donnell, M. Goodfellow et D.E. Minnikin. (1987). SIMCA pattern recognition in the analysis of streptomycete fatty acids. J. Gen. Microbiol. 133: 1137–1147 p.

Saddler, G.S., M. Goodfellow, D.E. Minnikin et A.G. O'Donnell (1986). Influence of the growth cycle on the fatty acid and menaquinone composition of *Streptomyces cyaneus* NCIB 9616. J. Appl. Microbiol. 60: 51–56 p.

Saffroy S. (2006). Etude du métabolisme carboné chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doctorat. Institut national polytechnique de lorraine. Ecole Nationale Supérieure d'Agronomie et des Industries Alimentaires. 6-36 p.

Saitou, N. et Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol., 4: 406–425 p.

Sakharkar Kishore R., Sakharkar Meena K. et Chow Vincent T. K. (2008). Biocomputational Strategies for Microbial Drug Target Identification. From: Methods in Molecular Medicine, Vol.142: New Antibiotic Targets. Edited by: W. Scott Champney. Humana Press Inc., Totowa, NJ. 2 p.

Salwan R., Sharma V., Sharma A. et Singh A. (2020). Molecular Imprints of Plant Beneficial *Streptomyces sp.* AC30 and AC40 Reveal Differential Capabilities and Strategies to Counter Environmental Stresses. Microbiological Research. Elsevier. 3 p.

Sanglier, J.J., D. Whitehead, G.S. Saddler, E.V. Ferguson et M. Goodfellow (1992). Pyrolysis mass spectrometry as a method for the classification, identification and selection of actinomycetes. Gene 115: 235–242 p.

Santos-Beneit F. (2018). Genome sequencing analysis of *Streptomyces coelicolor* mutants that overcome the phosphate-dependent vancomycin lethal effect. BMC Genomics 19:457 p.

Sharma M., Dangi P. et Choudhary M. (2014). Actinomycetes: Source, Identification, and Their Applications International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences. Volume 3 Number 2. pp. 801-832 p.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1968a) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. II. Species descriptions from first study. Int J Syst Bacteriol. 18: 69-189 p.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1968b). Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. III. Additional species descriptions from first and second studies. Int J Syst Bacteriol. 18: 279-392 p.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1969) Cooperative description of type cultures of *Streptomyces*. IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. Int J Syst Bacteriol. 19: 391-512 p.

Shirling E. B. et Gottlieb D. (1972) Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. V. Additional descriptions. Int J Syst Bacteriol. 22: 265-394 p.

Shirling, E. B. et Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol., 16: 313–340 p.

Siddique S., Syed Q., Adnan A., Nadeem M., Muhammad I. et Qureshi F. A. (2013). "Production of Avermectin B1b From *Streptomyces avermitilis* 41445 by Batch Submerged Fermentation." Jundishapur J Microbiol. 6(8): 71-98 p.

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 p.

Silver Lynn L. (2017). Fosfomycin: Mechanism and Resistance. Cold Spring Harb Perspect Med. 2 p.

Sköld O. (2011). Glycopeptides. Antibiotics and Antibiotics Resistance, First Edition. John Wiley et Sons, Inc. 93 p et 123 p.

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement de l'université de Toulouse. 31-32 p.

Smaoui S., Mathieu F., Fourati Ben fgura L., Merlina G. et Mellouli L. (2011). Taxonomy and antimicrobial activities of a new *streptomyces* sp. Tn17 isolated in the soil from an oasis in Tunis. Arch. Biol. Sci., Belgrade, 63 (4), 1047-1056.

Solanki R. Khanna M. et Lal R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. Indian J Microbiol; 48: 410-431 p.

Solecka J., Zajko J., Postek M. et Rajnisz A. (2012). - Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. Cent. Eur. J. Biol., 7, 373-390 p.

Souagui, Y., Tritsch, D., Grosdemange-Billiard, C. et 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 p.

Stackebrandt E., Liesack W., Webb R. et Witt D. (1991a) Towards a molecular identification of *Streptomyces* species in pure culture and in environmental samples. Actinomycetologia.5: 38-44 p.

Stackebrandt E., Witt D., Kemmerling C., Kroppenstedt R. et Liesack W. (1991b) Designation of streptomycete 16S and 23S rRNA-based target regions for oligonucleotide probes. Appl Environ Microbiol. 57: 1468-1477 p.

Stadler M. et Dersch P. (2016). How to Overcome the Antibiotic Crisis. Facts, Challenges, Technologies and Future Perspectives. Current Topics in Microbiology and Immunology. Springer Nature Switzerland.254-260 p.

T

Takahashi Y. et Nakashima T. (2018). Actinomycetes, an Inexhaustible Source of Naturally Occurring Antibiotics. Kitasato Institute for Life Sciences, Kitasato University,5-9-1 Shirokane, Minato-ku,Tokyo108-8641, Japan. 2 p.

Tamura K., Sudhir K. et Glen S. (2016). MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets. Mol. Biol. Evol. 33(7):1870–1874 p.

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 sciences biologiques. Ecole Normale Supérieure de Kouba-Alger. 74-76 p.

Tata S., Aouiche A., Bijani C., Bouras N., Pont F., Mathieu F., Sabaou N. (2019). Mzabimycins A and B, novel intracellular angucycline antibiotics produced by *Streptomyces* sp.PAL114 in synthetic medium containing L-tryptophan, Saudi Pharmaceutical Journal. Elsevier. 1 p.

Thakur D, Yadav D, Gogoi BK. et Bora TC. (2007). Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. J Mycol Med;17:242-9 p.

Toumatia O., (2015). Etude 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. Université d'Alger. 266 p.

Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouni A., (2014). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. J. Basic. Microbiol, 54: 1-8 p.

Toussaint M. (2018). Exploitation et exploration de la diversité génétique d'une population naturelle de *Streptomyces* issue d'un micro-habitat sol. Thèse de Doctorat en Écotoxicologie, Biodiversité, Écosystèmes. Université de Lorraine. 29-30 p.

V

Valanarasu M., Duraipandiyan V., Agastian P et Ignacimuthu S. (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). J Mycol Med;19:22-8 p.

Valanarasu M., Duraipandiyan V., Agastian P. et Ignacimuthu S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. J Mycol Med; 18: 147-53 p.

Valanarasu M., Kannan P, Ezhilvendan S., Ganesan G., Ignacimuthu S. et Agastian P. (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. J Mycol Med;20: 290-7 p.

Van der Heul H.U., Bohdan L.B., Kenneth J. Mc D., Ryan F. Seipke et Gilles P. van W. (2018). Regulation of antibiotic production in Actinobacteria: new perspectives from the post-genomic era. in the journal: The Royal Society of Chemistry Natural Product Reports. 577 p.

Viaene T., Langendries S., Beirinckx S., Maes M. et Goormachtig S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. Mini review. FEMS Microbiology Ecology, Vol.92, No. 8. 1-2 p.

W

Waksman, S. A. (1961). The Actionmycetes. Vol. 2, Classification, identification and descriptions of genera and species. J. Pharm. Sci., 50: 979 p.

Wellington, E.M.H. et S.T. Williams (1981). Host ranges of phage isolated to *Streptomyces* and other genera. Zentralbl. Bakteriол. Abt. I. Suppl. 11: 93–98 p.

Whitman, W., Goodfellow, M., Kämpfer, P., Busse, H.-J., Trujillo, M., Ludwig, W. et Suzuki, K. (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology: Volume 5: The Actinobacteria. Springer Science et Business Media.

Williams S. T., Goodfellow M., Alderson G., Wellington E. M. H., Sneath P. H. A. et Sackin M. J. (1983a) Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. J Gen Microbiol. 129: 1743-1813 p.

Williams S. T., Goodfellow M., Wellington E. M. H. Vickers J. C., Alderson G., Sneath P. H. A., Sackin M. J. et al. (1983b) A probability matrix for identification of some streptomycetes. J Gen Microbiol. 129: 1815-1830 p.

Williams S.T., Goodfellow M. et Alderson G. (1989) Genus *Streptomyces*, dans: Williams S.T., Sharpe M.E. et Holt J.H. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (volume 4). Williams et Wilkins, USA: 2452-2492.

Wink J., Mohammadipanah F. et Hamedi J. (2017). Biology and Biotechnology of Actinobacteria. eBook. Springer International Publishing AG. 380 p.

X

Xinxuan W., Lili H., Zhensheng K., Heinrich B. et Xiaoning G. (2010). Optimization of the Fermentation Process of Actinomycete Strain Hhs.015T. Journal of Biomedicine and Biotechnology.

Y

Yekkour A., Meklat A., Bijani C., Toumatia O., Errakhi R., Lebrihi A., Mathieu F., Zitouni A. et Sabaou N. (2015). A novel hydroxamic acid-containing antibiotic produced by a Saharan soil-living *Streptomyces* strain. The Society for Applied Microbiology. 590-591 p.

Z

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. et Sabaou N. (2005). *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. Research in Microbiology, 156: 984-993 p.

Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. et Lebrihi A., (2004b). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. Journal of Antibiotics, 57: 367-372 p.

Zitouni A., Lamari L., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Gaouar A., Mathieu F., Lebrihi A. et Labeda D.P., (2004a). *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 54: 1377-1381 p.

ANNEXES

Annexe 1

Appareils, verreries et matériel consommables

1. Appareillage



Figure 21. Photographie d'un shaker de la marque «New Brunswick Scientific».



Figure 22. Photographie d'une micro-centrifugeuse des éppendorfs sigma 1-14.



Figure 23. Photographie d'une centrifugeuse de la marque JUAN E96.



Figure 24. Photographie d'une balance.



Figure 25. Photographie d'un pH mètre (Hanna Instruments PH211).



Figure 26. Photographie d'une étuve de la marque etuvesmemmert.



Figure 27. Photographie d'un autoclave de la marque pbi 96 de 65 litre.



Figure 28. Photographie d'un rotavapeur de la marque BUCHI Rotavapor R210.

- Vortex
- Réfrigérateur LG 400L.
- Micropipette de 10 μ l, 100 μ l, 1000 μ l

2. Verreries et matérielle consommables : Erlenmeyer, tube à essai, crousée, bécher, entonnoir, boîte pétri, éppendorfs, embouts.

Annexe 2

Milieux de culture.

Gélose nutritive	Milieu ISP2(International <i>Streptomyces</i> Project 2)
Peptone..... 5 g. Extrait de viande..... 1 g. Extrait de levure2 g. NaCl.....5 g. Agar.....15 g. Eau distillée..q.s.p.1000 mL, pH 7,5.	Glucose 4 g. Extrait de levure 4 g. Extrait de Malt 10 g. Eau distillée 1000 ml.
Milieu MSS	Milieu MS
NaCl..... 2 g. K ₂ HPO ₄ 1 g. KH ₂ PO ₄ 0,5 g. MgSO ₄ , 7H ₂ O..... 0,2 g. CaCO ₃ 3 g. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g. Extrait de levure 3 g. Eau distillée..... 1000 ml	NaCl..... 2 g. K ₂ HPO ₄ 1 g. KH ₂ PO ₄ 0,5 g. MgSO ₄ , 7H ₂ O..... 0,2 g. CaCO ₃ 3 g. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g. Eau distillée..... 1000 ml
Milieu ISP4	
Amidon10 g. K ₂ HPO ₄1 g. MgSO ₄ ,7H ₂ O..... 1 g. NaCl..... 1 g. (NH ₄) ₂ SO ₄ 2 g.	CaCO ₃ 2 g. Solution saline standard* 1 mL. Agar.....20 g; Eau distillée..... 1000 mL.
(*)Solution saline standard: FeSO ₄ , 7H ₂ O: 0,1 g; MnCl ₂ , 4H ₂ O: 0,1 g; ZnSO ₄ , 7H ₂ O: 0,1 g; eau distilléeq.s.p. 100 mL.	
Milieu CHV(Hayakawa et Nonomura (1984))	
Chitine2 g. K ₂ HPO ₄ 0,35 g. KH ₂ PO ₄ 0,15 g. MgSO ₄ , 7H ₂ O..... 0,2 g. NaCl,..... 0,3 g. CaCO ₃ 0,02 g. 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.	FeSO ₄ ,7H ₂ O..... 10 mg. ZnSO ₄ ,7H ₂ O..... 1 mg. MnCl ₂ ,4H ₂ O.....1 mg. Agar.....18 g. eau distilléeq.s.p., 1000 mL.pH: 7,2. Une solution stérile d'un antifongique, le cycloheximide (ou actidione) à 80 mg/L. Une solution stérile d'un acide nalidixiques (anti Gram négative) à raison de 50 mg/l

Annexe 3

Étude physiologique

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

- ◆ **Milieu minéral de base** : $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$: 1 g ; KCl : 0,02 g ; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 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, D-fructose, D-galactose, D-glucose, *myo*-inositol, D-lactose, D-maltose, D-mannitol, D-mannose, D-mélibiose, α méthyle D-glucoside, D-raffinose, L-rhamnose, D-ribose, saccharose, D-sorbitol, D-tréhalose 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

2. Dégradation de divers composés organiques

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.

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.

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'ensemencement (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.

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

4 g de gélatine sont ajoutés dans 100 mL de gélose nutritive. L'ensemencement (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).

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.

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.

2.6. Dégradation du Tween 80(Sierra, 1957)

Tween 80: 10 mL; NaNO₃ : 1 g; extrait de levure: 5 g; solution saline (*): 50 mL; CaCl₂, 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.

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.

4. Production de pigments mélanoïdes

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.

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.

Annexe 4

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 μ L d'une solution de lyse, préalablement stérilisée par filtration, et composée de 400 mM de trisHCl (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 μ L 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 12000rpm. Un volume de 400 μ L 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 μ L 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 μ L 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: $DO_{260\text{ nm}} / DO_{280\text{ nm}}$ 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:

- ◆ $[ADN] = DO_{260\text{ nm}} \times 50 \times \text{facteur de dilution } (\mu\text{g/mL})$. Remarque: 1 unité $DO_{260\text{ nm}} = 50 \mu\text{g/mL}$ 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 MgCl_2 0,1% Triton X-100; 0,2 mg/mL de Bovine SerumAlbumin (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 MyCycler™ 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 un 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'éthidium (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**).

Étude des propriétés antagonistes et antimicrobiennes d'une souche d'actinobactéries *Streptomyces sp.* AH08.

Résumé: La présente étude s'intéresse d'une part à la taxonomie d'une souche d'actinobactéries AH08 et d'autre part à sa capacité de produire les antibiotiques en évaluant leur activité antimicrobienne et leurs propriétés antagonistes contre des germes pathogènes ainsi que l'extraction de ces antibiotiques sécrétés.

L'étude taxonomique réalisée sur la base des caractéristiques morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires a permis de rattacher notre souche au genre *Streptomyces*, avec une similarité 99,57 % avec la souche *S. djakartensis* NBRC15409^T. La recherche des meilleures conditions nutritionnelles a été réalisée en suivant des cinétiques de production, de croissance, de pH et de l'activité antimicrobienne, dans des milieux de culture synthétiques (MS) et semi-synthétiques (MSS) additionnés de 3 sources de carbone : amidon, dextrine, glycérol. Les résultats de la cinétique révèlent que la production est maximale dans le milieu MS avec amidon (MSA) au 5^{ème} jour de fermentation, à un pH basique et durant les phases exponentielle et de déclin de croissance. Les tests de l'activité antimicrobienne et antagoniste ont révélé que la souche AH08 est douée d'une bonne activité antibactérienne, antifongique et antagoniste à large spectre d'action, la plus grande activité est notée contre *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) avec une zone d'inhibition de 45 mm dans le milieu MSA et le plus grand potentiel antagoniste est dirigé contre *Micrococcus luteus* avec une zone d'inhibition de 57 mm dans le milieu ISP2. L'extraction des antibiotiques par les solvants organiques a été suivie par un test d'antibiographie, les résultats ont montré que le dichlorométhane c'est le meilleur solvant.

Les résultats expérimentaux obtenus ouvrent des perspectives positives pour poursuivre le travail et pour des bonnes exploitations industrielles de la souche et ses antibiotiques.

Mots clés: Taxonomie, *Streptomyces* AH08, germes pathogènes, antagoniste, activité antimicrobienne, antibiotique.

Study of the antagonistic and antimicrobial properties of a strain of actinobacteria *Streptomyces sp.* AH08.

Abstract : This study investigates the taxonomy of the strain of actinobacteria AH08, as well as its capacity to produce antibiotics by evaluating their antimicrobial activity and their antagonistic properties against pathogenic germs and also the extraction of these secreted antibiotics.

The taxonomical study was performed on the basis of morphological, chemical, physiological and molecular characteristics which allows to attach the strain AH08 to the genus *Streptomyces* with 99, 57% of similarity with the strain *S. djakartensis* NBRC15409^T. The search for the best nutritional conditions was carried out by following the kinetics of production, growth, pH and antimicrobial activity, in synthetic (MS) and semi-synthetic (MSS) culture media with the addition of 3 carbon sources: starch, dextrin, glycerol. The results of the kinetics show that the maximum production is obtained in the medium MS added with starch at day 5 of fermentation, at a basic pH and during the exponential and growth decline phases. The tests of antimicrobial activity and antagonist revealed that the strain AH08 is endowed with an antibacterial, antifungal activities and an antagonist potential with broad-spectrum, the greatest activity is noted against *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) with an inhibition zone of 45 mm in the MSA medium and the greatest antagonist potential is directed against *Micrococcus luteus* with an inhibition zone of 57 mm in the ISP2 medium. Solvents extraction of antibiotics was followed by an antibiography test, the results showed that dichloromethane is the best solvent.

The experimental results obtained open up positive prospects for continuing the work and for good industrial exploitation of the strain and its antibiotics.

Keywords: Taxonomy, *Streptomyces* AH08, pathogenic germs, antagonist, antimicrobial activity, antibiotic.

دراسة الخصائص التضادية والنشاط ضد الميكروبات لسلالة الأكتينوبكتيريا *Streptomyces sp.* AH08

ملخص: تهتم هذه الدراسة بتصنيف سلالة الأكتينوبكتيريا AH08 بالإضافة لدراسة قدرتها على إنتاج المضادات الحيوية من خلال تقييم نشاطاتها المضادة للميكروبات وخواصها التضادية؛ وذلك باستهداف جراثيم مسببة للأمراض فضلا عن استخراج هذه المضادات الحيوية التي تفرزها. اعتمدنا في الدراسة التصنيفية على الخصائص المظهرية، الكيميائية، الفيزيولوجية والجزيئية التي تربط السلالة AH08 للجنس *Streptomyces* بنسبة تشابه تصل حتى 99,57 % مع السلالة *S. djakartensis* NBRC15409^T. قمنا بالبحث عن المصادر الغذائية المثلى لإنتاج المضادات الحيوية عن طريق متابعة حركية الإنتاج، درجة حموضة الوسط ونشاطها المضاد للميكروبات في الأوساط MS و MSS مضاف لها 3 مصادر للكربون : النشاء، الديكسترين والغليسيرول. حيث أظهرت النتائج أن الإنتاج يكون في قيمته المثلى في الوسط MS المضاف له النشاء في اليوم الخامس من التخمر، في درجة حموضة قاعدية وأثناء طور النمو الأسّي وطور التحلل. أظهرت الاختبارات الخاصة بدراسة النشاط المضاد للبكتيريا والخصائص التضادية أن السلالة AH08 تتمتع بنشاط جيد ضد البكتيريا والطفيليات وكذا قدرة تضادية نوا طيف واسع. أكبر نشاط بكتيري سجل ضد *Staphylococcus aureus* (MRSA639c) حيث بلغ قطر منطقة التثبيط 45 مم في الوسط MSA وأكبر قيمة للقدرة التضادية سجلت ضد *Micrococcus luteus* وبلغ قطر منطقة التثبيط 57 مم في الوسط ISP2. يتبع استخراج المضادات الحيوية باستعمال مذيبيات عضوية باختبار الكشف التضادي حيث أظهرت نتائج هذا الإختبار أن الديكلوروميثان هو المذيب الأمثل.

النتائج التجريبية التي تم الحصول عليها خلال هذه الدراسة تفتح أفقا إيجابية لمواصلة العمل والاستغلال الصناعي الجيد للسلالة ومضاداتها الحيوية.

الكلمات المفتاحية: تصنيف، *Streptomyces* AH08، جراثيم مسببة للأمراض، قدرة تضادية، نشاط مضاد للميكروبات، مضاد حيوي.