

**République Algérienne Démocratique et populaire**

**Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche scientifique**



**FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE ET DES SCIENCES DE LA TERRE**

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

**Domaine :** Science de la Nature et de la Vie

**Spécialité :** Microbiologie appliquée

## **THEME**

**Étude taxonomique et mise en évidence du pouvoir  
antagoniste de quelques souches bactériennes**

Présenté par : M<sup>lle</sup> DJELLAL Khawla F/Z

M<sup>lle</sup> LAREF Nawel

Soutenu le : **30 Juin 2018** devant le jury composé de :

|   |                           |                    |
|---|---------------------------|--------------------|
| Présidente : M. ACHEK R.                    | Maitre Assistant – A      | UDB Khemis-Miliana |
| Promoteur : M. AOUCHE A.                    | Maitre de Conférences – A | E.S.S.A.I.A.       |
| Co-promoteur : M. CHEURFA M.                | Maitre de Conférences – B | UDB Khemis-Miliana |
| Examinatrice : M <sup>me</sup> GUETARNI H.  | Maitre de Conférences – B | UDB Khemis-Miliana |
| Examinatrice : M <sup>me</sup> SAADI F.     | Maitre de Conférences – B | UDB Khemis-Miliana |
| Examinatrice : M <sup>me</sup> LAISSAOUI A. | Maitre Assistante – B     | UDB Khemis-Miliana |

## AVANT-PROPOS

le présent travail a été réalisé au laboratoire de microbiologie de l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires d'El-Harrach (ESSAIA - Alger). La thématique de ce travail a été proposée par le Dr. AOUICHE A., Maitre de conférences-A à l'ESSAIA auquel nous tenons à exprimer nos sincères remerciements pour nous avoir encadrés de près tout au long de nos travaux, pour ses encouragements et orientations, sa patience et sa gentillesse. Nous tenons également à remercier notre co-encadreur monsieur CHERFA M., maitre assistant B à l'université de Khemis Miliana pour ses précieux conseils.

Nous tenons à adresser nos vifs remerciements :

- A M<sup>me</sup> GUITARNI Hassina, pour l'honneur qu'elle nous fait en acceptant de présider le jury.
- A M<sup>me</sup> SAADI Fadhila, d'avoir accepté d'examiner le présent travail.
- Nous remercions également M<sup>me</sup> LAISSAOUI Aichad d'avoir accepté d'examiner ce travail.

Nous remercions également M<sup>me</sup> SAIDI Hadjer pour ses encouragements et ses conseils qui nous ont beaucoup aidés.

Nous tenons à remercier tous nos camarades et amies Khelifi Nihed et Mohammedi Roza pour leur aide, soutien et gentillesse. Nous vous remercions infiniment.

Nous associons à nos remerciements toute l'équipe du laboratoire de microbiologie de l'ESSAIA pour leur gentillesse, leur aide et leur disponibilité.

Nous exprimons aussi nos remerciements et notre reconnaissance à tous nos enseignants de l'Université Djilali BOUNAAMA.

## Dédicaces

*A mon très cher Père Yahia, l'épaule solide, l'œil attentif compréhensif et la personne la plus digne de mon estime. En témoignage de l'amour, affection et le soutien que tu m'as offerts depuis ma naissance. Pour toutes les peines et tous les sacrifices que tu as consentis pour mon éducation, tu m'as appris à me battre jusqu'au bout pour réussir, je n'ai été guidée jusqu'à présent que par le désir de t'honorer. Aucun mot ne saurait exprimer l'amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction, pour mon éducation et mon bien être. Ce travail est le fruit de tes innombrables sacrifices.*

*A ma très chère mère Akila, à la plus douce des mamans. Ta prière et ta bénédiction m'ont été d'une grande aide pour mener à bien mes études. Tu as été très patiente, tu as passé de longues nuits et vécu des moments d'angoisse pendant toutes mes années d'études, tu m'as comblée avec ta tendresse. Pour tous les sacrifices que tu n'as cessé de me donner depuis ma naissance, durant mon enfance et même à l'âge adulte.*

*Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez. Puisse Dieu, le Très Haut, vous accorder santé, bonheur et longue vie et faire en sorte que jamais je ne vous déçoive.*

*A ma très chère sœur Marwa, la prunelle de mes yeux, la douce, au cœur si grand. A mon très cher petit frère Youcef, j'ai toujours su que j'ai le plus beau et le plus adorable des petits frères. Vous m'avez toujours apporté amour, soutien et compréhension. En témoignage de mon affection fraternelle, de ma profonde tendresse et reconnaissance, je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que Dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.*

*A ma grand-mère chérie, Qui m'a accompagné par ses prières, sa douceur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé et de bonheur dans les deux vies.*

*A la mémoire de mes grands-pères et ma grand-mère J'aurais tant aimé que vous soyez présents. Que Dieu ait vos âmes dans sa sainte miséricorde.*

*A mes chers oncles, tantes, leurs époux et épouses*

*A mes chers cousins et cousines*

*A ma chère Mama Meriem, pour son accueil chaleureux et son grand cœur, puisse Dieu lui prêter longue vie et beaucoup de santé.*

*Veillez trouver dans ce travail l'expression de mon respect le plus profond et mon affection la plus sincère.*

*A mes sœurs de cœur Hiba, Hafsa, Bouchra et Ryma. En souvenir de notre sincère et profonde amitié et des moments agréables que nous avons passés ensemble.*

*Une spéciale dédicace à cette personne qui compte déjà énormément pour moi, et pour qui je porte beaucoup de tendresse et de respect.*

*A toi Lyes*

*A mon binôme et meilleure amie Nawel.*

... Khawla

*...A l'issu de mon travail, Je dédie affectueusement ce mémoire :*

*Aux deux êtres les plus chères au monde qui ont souffert nuit et jour Pour nous couvrir de leur amour : mes parents.*

*A ma très chère mère HOURIA, qui ma soutenu tout au long de mes études par son amour et sa prières.*

*A mon cher père AHMED pour sa patience avec moi et son encouragement.*

*A ma très chère grande mère*

*A chère mama Meriem*

*Je demande à Dieu les protéger et leur réserver une longue vie.*

*A mon très cher frère MOHAMED*

*A mes chères sœurs KHADIDJA et SARAH*

*A mon fiancé ISMAIL et sa famille*

*A ma tante et ma cousine RAWIA*

*A mes chère amis ; Hanane, Souad, Manel, Houria, Fouzia et Sanaa.*

*A mon binôme Khawla*

*A toute la promotion master 2016-2018 /Option Microbiologie  
Appliquée du Département des SNV, Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie et des Sciences de la Terre  
Université Djillali Baonaama Kfimis miliana*

*...NAWEL*

## Index des figures

|             |  |           |
|-------------|--|-----------|
| Figure n°1  | Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries   | <b>05</b> |
| Figure n°2  | Différents chimiotypes rencontrés chez les actinobactéries   | <b>06</b> |
| Figure n°3  | Photo illustrant la mise en évidence du pouvoir antagoniste des actinobactéries par la méthode des stries croisées   | <b>17</b> |
| Figure n°4  | Schéma illustrant le résultat de l'activité antimicrobienne obtenu par la méthode des cylindres d'agar lors de la cinétique de production des antibiotiques (*)  | <b>18</b> |
| Figure n°5  | Schéma explicatif représentant la direction des deux séquences Forward et Reverse lors du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S  | <b>20</b> |
| Figure n°6  | Schéma explicatif montrant la position des séquences F et R avant et après alignement par logiciel Bio-informatique MEGA 7   | <b>21</b> |
| Figure n°7  | Schéma explicatif montrant la manière par laquelle la séquence complète de l'ADN codant pour l'ARNr16S est obtenue par logiciel Bio-informatique MEGA 7  | <b>22</b> |
| Figure n°8  | Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S, montrant la relation entre l'isolat bactérien X et les souches-types du même genre, en l'occurrence <i>Streptomyces</i> | <b>23</b> |
| Figure n°9  | Micromorphologie de la souche PA14 poussant sur milieu ISP2, observée au microscope photonique.  | <b>24</b> |
| Figure n°10 | Micromorphologie de la souche PA07 poussant sur milieu ISP2, observée au microscope photonique   | <b>25</b> |
| Figure n°11 | Micromorphologie de la souche PA03 poussant sur milieu ISP2, observée au microscope photonique   | <b>25</b> |
| Figure n°12 | Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant la relation entre PA07 et les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i>                                    | <b>28</b> |
| Figure n°13 | Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant la relation entre PA14 et les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i>                                    | <b>30</b> |
| Figure n°14 | Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S montrant la relation entre PA03 et les souches-types des espèces du genre <i>Lentzea</i> , <i>Actinosynnema</i> et <i>Lechevaliera</i>               | <b>32</b> |
| Figure n°15 | Cinétiques de production des activités antimicrobiennes de la souche PA07 sur milieu ISP2 solide.  | <b>38</b> |

## Index des tableaux

|              |   |           |
|--------------|---|-----------|
| Tableau n°1  | Différents types de phospholipides membranaires   | <b>07</b> |
| Tableau n°2  | Classification des antibiotiques selon leur structure chimique  | <b>11</b> |
| Tableau n°3  | Profils de résistance des bactéries-cibles utilisées aux antibiotiques  | <b>15</b> |
| Tableau n°4  | Concentrations minimales inhibitrices des champignons filamenteux cibles vis-à-vis de divers composés antifongiques.  | <b>16</b> |
| Tableau n°5  | Caractéristiques culturales des trois souches d'actinobactéries étudiées  | <b>26</b> |
| Tableau n°6  | Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de la souche PA07 avec les souches- types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i>                             | <b>27</b> |
| Tableau n°7  | Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de l'isolat PA14 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i>                               | <b>29</b> |
| Tableau n°8  | Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de l'isolat PA03 les souches-types de toutes les espèces des genres <i>Lentzea</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Lechevaliera</i> | <b>31</b> |
| Tableau n°9  | Comparaison des caractères morphologiques de PA03 avec l'espèce la plus proche phylogénétiquement <i>Lentzea albida</i>   | <b>33</b> |
| Tableau n°10 | Comparaison des caractères morphologiques de PA14 avec les espèces de <i>Streptomyces griseoflavus</i> et <i>S. griseorubens</i> les plus proches phylogénétiquement          | <b>34</b> |
| Tableau n°11 | Comparaison des caractères morphologiques de l'isolat PA07 avec les espèces de <i>Streptomyces</i> les plus proches phylogénétiquement  | <b>35</b> |
| Tableau n°12 | Activité antimicrobienne des 03 actinobactéries sur milieux solides ISP2 et Bennett   | <b>36</b> |
| Tableau n°13 | Résultats des activités antimicrobiennes de la souche PA07 suivie durant 10 jours vis-à-vis de quatre microorganismes-cibles  | <b>37</b> |

## Liste des abréviations

AC : *Aspergillus carbonarius*

ADN : acides désoxyribonucléique

ADNr 16s : acide désoxyribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S

AF : *Aspergillus flavus*

Am: amphotéricine B

AMC: amoxicilline+clavulanate,

AMX: amoxicilline

AO : *Aspergillus ochraceus*

ARN : acide ribonucléique

ARNr 16S : acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S

ATCC: American Type Culture Collectio006E

BAC: bacitracine

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

C: chloramphénicol

C° : degré Celsius

CAR:carbénicilline

CAZ:ceftazidime

CF: céfalotine

C.M.I : concentrations minimales inhibitrices

CTX: céfotaxime

CXM: céfuroxime

CYC: cyclosérine

Cyc: cycloheximide

DAP : acide diaminopimélique

DAB : acide 2,4 diaminobutyrique

ERY: érythromycine

F : Forward

FC : *Fusariumculmorum*

FOX: céfoxitine

G+C: Guanine +cytosine (Coefficient de Chargaff)

GEN: gentamicine

g : gramme

h : heure

I: itraconazole

ISP2 : l'International *Streptomyces* Project (milieu de culture)

K: kanamycine

KAS: kasugamycine

L : litre

MA : mycélium aérien

ml : Millilitre

mm : Millimètre

MS : mycélium du substrat

NEO: néomycine

NCBI : National Center for Biotechnology Information

ND: non déterminé

N: nystatine

OXY: oxytétracycline

OLE: oléandomycine

PA : palmeraies

PCR : Polymérase Chain Réaction

PEN: pénicilline G

pH : potentiel Hydrogène

PIP: pipéracilline

PLP : protéines de liaison à la pénicilline

POLB: polymyxine B

R : Reverse

RA, :*Retinaculum Apertum*

RF : *Rectus Flexibilis*

RIF: rifampicine,

S : *Spira* (chaînes spiralées)

s : sporophore

c. sp; chaînes de spores

sp. i : spores isolées

sp. m :spores mobiles

sg : sporanges

SPI: spiramycine,

SSS: sulfamide

T: thioconazole

TCC: ticarcilline + clavulanate,

Th: terbinafinehydrochloride

TIC: ticarcilline,

VAN: vancomycine,

UFC :Unité formant colonie

UR : *Umbelopsisramanniana*NRRL1829

## Résumé

Trois souches d'actinobactéries nommées PA03, PA07 et PA14 ont fait l'objet d'une étude taxonomique basée sur l'étude morphologique (macro et micromorphologie) et sur l'analyse phylogénétique des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S par outils bioinformatiques (logiciel MEGA 7). Les résultats ont permis de rattacher les deux isolats (PA07 et PA14) au genre *Streptomyces* et l'isolat PA03 au genre *Lentzea*. L'isolat PA14 est proche de l'espèce *Streptomyces griseoflavus*, PA07 de *Streptomyces fimicarius* et PA03 de *Lentzea albida*.

Sur le plan antagoniste, l'activité antimicrobienne a été évaluée par méthode des stries croisées sur milieux ISP2 et Bennett contre neuf microorganismes-cibles (quatre bactéries dont 03 multirésistantes aux antibiotiques et cinq champignons pathogènes et/ou toxigènes). Les trois isolats ont montré des activités intéressantes et le meilleur isolat (PA07) a été retenu pour la cinétique de production des activités antimicrobiennes.

**Mots clés:** actinobactérie, taxonomie, phylogénie, bio-informatique, antagonisme, pathogène, antibiotiques, ADRr 16S, MEGA7.

## Abstract

Three origins of actinobacteria named PA03, PA07 and PA14 was the object of a study taxonomique based on the morphological study (macro and micromorphology) and on the phylogenetic analysis of DNA sequences coding for the ARNr 16S by biocomputing tools (MEGA software 7). The results allowed to connect both isolates (PA07 and PA14) with the types *Streptomyces* and the isolate PA03 in the types *Lentzea*. The isolate PA14 is close to the species *Streptomyces griseoflavus*, PA07 of *Streptomyces fimicarius* and PA03 of *Lentzea albida*. The results allowed to connect both isolates (PA07 and PA14) with the types *Streptomyces* and the isolate PA03 in the types *Lentzea*. The isolate PA14 is close to the species *Streptomyces griseoflavus*, PA07 of *Streptomyces fimicarius* and PA03 of *Lentzea albida*.

On the opposing plan, antimicrobial activity was estimated by method of streak crossings on circles in ISP2 and Bennett against nine microorganisms-targets (four bacteria among which multiresistant 03 in antibiotics and five pathogenic mushrooms and/or toxinogènes). Three isolates showed interesting activities and the best isolate ( PA07) was retained for the kinetics of production of the antimicrobial activities.

**Keywords:** actinobacteria, taxonomy, phylogénie, bio-computing, antagonism, pathogenic, antibiotics, MEGA7, ADNr 16S.

## الملخص

تناولنا في هذا البحث دراسة ثلاث سلالات من الأكتينوباكتريا و المسماة PA03 و PA07 و PA14 حيث كانت موضوعاً لدراسة تصنيفية مبنية على الدراسة المورفولوجية (الكلية والميكرومورفولوجية) والتحليل الوراثي لتسلسل القطعة المورثية rRNA16S المشفرة لـ DNA الريبوزومي بواسطة أنظمة معلوماتية بيولوجية برنامج (MEGA 7).

أظهرت النتائج المتحصل عليها انتماء العزلين PA07 و PA14 إلى الجنس Streptomyces والعزل PA03 إلى الجنس Lentzea. حيث أن العزلة PA14 قريبة من الأنواع Streptomyces griseoflavus, و PA07 من Streptomyces fomicarius و PA03 من Lentzea albida.

من حيث فعالية التضاد، تم تقييم النشاط المضاد للميكروبات عن طريق خطوط متقاطعة على الوسط الزراعي ISP2 والوسط الزراعي Bennett ضد تسع كائنات دقيقة مستهدفة (أربعة بكتيريا بما في ذلك 03 مقاومة للمضادات الحيوية وخمس فطريات ممرضة و / أو سمية).

أظهرت العزلات الثلاث أنشطة مثيرة للاهتمام وتم الإبقاء على أفضل عزلة (PA07) لإنتاج حركية الأنشطة المضادة للميكروبات.

**الكلمات المفتاحية:** الأكتينوباكتريا ، علم الوراثة , علم التصنيف ، أنظمة معلوماتية بيولوجية , فعالية التضاد , ممرضة , المضادات الحيوية , ADNr 16S , MEGA7

|                               |  |
|-------------------------------|--|
| <b>Avant-propos</b>           |  |
| <b>Dédicaces</b>              |  |
| <b>Liste des figures</b>      |  |
| <b>Liste des tableaux</b>     |  |
| <b>Liste des abréviations</b> |  |
| <b>Résumé</b>                 |  |

## **Sommaire**

|                                   |           |
|-----------------------------------|-----------|
| <b>Introduction générale.....</b> | <b>01</b> |
|-----------------------------------|-----------|

### **PARTIE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE**

|  |           |
|--|-----------|
| <b>I. GENERALITES SUR LES ACTINOBACTERIES.....</b>   | <b>02</b> |
| 1. Définition et position taxonomique des actinobactéries Ecologie et habitat des actinobactéries..... | 02        |
| 2. Ecologie et habitat des actinobactéries.....  | 02        |
| 2.1. Les actinobactéries dans le sol.....  | 03        |
| 2.2. Les actinobactéries dans les milieux marins.....  | 03        |
| 3. Pouvoir pathogène des actinobactéries.....  | 03        |
| 4. Intérêt des actinobactéries.....  | 04        |
| <b>II. IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIES.....</b>   | <b>05</b> |
| 1. Etude macro-morphologique .....   | 05        |
| 2. Etude micro-morphologique.....  | 05        |
| 3. Etude chimio-taxonomique.....   | 05        |
| 3.1. Composition pariétale en acides aminés .....  | 07        |
| 3.2. Composition en glucides cellulaires.....  | 07        |
| 3.3. Composition membranaire et pariétale en lipides .....   | 08        |
| 4. Etude physiologique.....  | 08        |
| 5. Etude phylogénétique.....   | 09        |
| 5.1. Séquençage du gène codant pour l'ARN 16S.....   | 09        |

|   |   |           |
|---|---|-----------|
| 5.2.                                    | Hybridation ADN-ADN.....  | 09        |
| <b>III.</b>                             | <b>LES ANTIBIOTIQUES.....</b>   | <b>10</b> |
| 1.                                      | Historique et intérêt de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques..... | 10        |
| 2.                                      | Microorganismes producteurs d'antibiotiques.....                              | 10        |
| 3.                                      | Classification des antibiotiques.....   | 11        |
| 3.1.                                    | Classification basée sur la structure chimique.....                           | 11        |
| 3.2.                                    | Autres types de classification .....  | 11        |
| 4.                                      | Mécanismes d'action des antibiotiques.....                                    | 13        |
| 5.                                      | Mécanisme de résistance aux antibiotiques.....                                | 13        |
| 5.1.                                    | Mécanisme enzymatique.....  | 13        |
| 5.2.                                    | Mécanisme non enzymatique.....  | 14        |
| 5.2.1.                                  | L'imperméabilité.....   | 14        |
| 5.2.2.                                  | Système d'efflux.....   | 14        |
| 5.2.3.                                  | Altération des cibles d'antibiotiques.....                                    | 14        |
| <b>PARTIE II : MATERIEL ET METHODES</b> |   |           |
| <b>I.</b>                               | <b>MATERIEL BIOLOGIQUE.....</b>   | <b>15</b> |
| 1.                                      | Souches d'actinobactéries.....  | 15        |
| 2.                                      | Microorganismes-cibles.....   | 15        |
| 2.1.                                    | Les bactéries-cibles.....   | 15        |
| 2.2.                                    | Les champignons filamenteux.....  | 16        |
| <b>II.</b>                              | <b>METHODES.....</b>  | <b>17</b> |
| 1.                                      | Revivification et purification des souches.....                               | 17        |
| 2.                                      | Activité antibiotique des actinobactéries sur milieux solides.....            | 17        |
| 2.1.                                    | Milieux de culture.....   | 17        |
| 2.2.                                    | Méthode des stries croisées.....  | 18        |
| 2.3.                                    | Cinétiques de production des antibiotiques en milieux solides.....            | 18        |
| 3.                                      | Etude taxonomique des souches d'actinobactérie.....                           | 20        |
| 3.1.                                    | Etude morphologique.....  | 20        |
| 3.1.1.                                  | Etude macro-morphologique.....  | 20        |

|  |    |
|--|----|
| 3.1.2. Etude micro-morphologique.....                                  | 20 |
| 3.2. Etude Phylogénétique et analyses par outils bioinformatiques..... | 20 |
| 3.2.1. Origine des séquences de l'ADN codant pour l'ARNr 16S.....      | 20 |
| 3.2.2. Traitement des séquences par outil bio-informatique.....        | 20 |
| 3.2.3. Détermination de l'espèce la plus proche par Blast.....         | 23 |
| 3.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique.....                     | 24 |

## **PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION**

|   |           |
|---|-----------|
| <b>I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOBACTÉRIES.....</b>                              | <b>25</b> |
| 1. Caractéristiques macro et micromorphologiques.....                             | 25        |
| 2. Etude phylogénétique.....  | 27        |
| 2.1. La souche PA07.....  | 27        |
| 2.2. La souche PA14.....  | 29        |
| 2.3. La souche PA03.....  | 32        |
| 3. Discussion.....  | 33        |
| 3.1. Détermination des genres d'actinobactéries.....                              | 33        |
| 3.2. Détermination des espèces d'actinobactéries.....                             | 34        |
| 3.2.1. Souche PA03.....   | 34        |
| 3.2.2. Souche PA14.....   | 34        |
| 3.2.3. Souche PA07.....   | 35        |
| <b>II. ACTIVITE ANTAGONISTE DES ACTINOBACTERIES.....</b>                          | <b>36</b> |
| 1. Activité antimicrobienne des actinobactéries par méthode des stries croisées.. | 36        |
| 1.1. Souche PA07.....   | 37        |
| 1.2. Souche PA14.....   | 37        |
| 1.3. Souche PA03.....   | 38        |
| 2. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes.....                   | 38        |
| 3. Discussion.....  | 39        |
| <b>CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....</b>  | <b>42</b> |
| <b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....</b>   | <b>44</b> |
| <b>ANNEXES.....</b>   | <b>45</b> |

## Introduction

La résistance aux antibiotiques est un phénomène qui ne cesse de s'amplifier causant des problèmes de santé et des échecs thérapeutiques et conduit à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses notamment nosocomiales (Touati, 2006; Messaï *et al.*, 2008 ; Durand-Parenti, 2010). Pour cette raison, la recherche de nouvelles molécules antibiotiques doit être l'une priorité en terme de stratégie de lutte contre les maladies infectieuses. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de microorganismes producteurs d'antibiotiques. En effet, les microorganismes et les plantes constituent la principale source naturelle d'antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2000) en plus des autres propriétés (antitumoraux, antiviraux, antiparasitaires, etc).

Parmi ces microorganismes, les actinobactéries sont les plus grands producteurs d'antibiotiques (Sangliet *et al.*, 1993 ; Takahashi et Omura, 2003 ; Genilloud *et al.*, 2010 ; Flatt *et al.*, 2013; Nakae *et al.*, 2013). Le genre *Streptomyces* est le plus important et est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques. Il est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de nombreux laboratoires dans le monde (Demain, 2006; Jose *et al.*, 2011). Par ailleurs, d'autres genres d'actinobactéries tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Amycolatopsis* etc., ont aussi montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes sur le plan médical (Nakae *et al.*, 2013).

En Algérie, les sols sahariens représentent des écosystèmes assez particuliers et ont montré une richesse et une biodiversité surprenante en actinobactéries (Sabaou *et al.*, 1992; Sabaou, 1998 ; Driche, 2010; Khebizi, 2010; Toumatia, 2010; Aouiche, 2010). Plusieurs souches d'actinobactéries se sont révélées être de nouvelles espèces et productrices de nouveaux antibiotiques (Lamari *et al.*, 2002; Zitouni *et al.*, 2004 et 2005; Boudjella *et al.*, 2006 ; Aouiche *et al.*, 2015).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs, l'étude taxonomique de quelques souches d'actinobactéries et la mise en évidence du pouvoir antagoniste de ces bactéries contre des microorganismes pathogènes et/ou toxigènes et multirésistants aux antibiotiques.

Ce travail est partagé en trois parties:

- ✓ La première partie de ce manuscrit est consacrée à une présentation bibliographique, d'une part, sur la taxonomie des actinobactéries et les antibiotiques d'une manière générale.
- ✓ La seconde partie est consacrée à la présentation du matériel et des méthodes utilisées
- ✓ La troisième partie, aux résultats obtenus et à leurs discussions.

## I. GENERALITES SUR LES ACTINOBACTERIES

### 1. Définition et position taxonomique des actinobactéries

Etymologiquement, l'origine de l'appellation actinobactéries, anciennement appelés actinomycètes, provient des mots grecs «Aktis = rayon» et «mykes = champignons» ce qui veut dire champignons à rayons. En effet, la faculté de la plupart de ces bactéries à former un réseau mycélien ressemblant à celui élaboré par les champignons filamenteux a poussé les scientifiques pendant longtemps à les considérer comme des formes intermédiaires entre les bactéries et les champignons (Krassilnikov, 1941 ; Ait Barka, 2016). Cependant, sur le plan micro-morphologique, le diamètre de leur filaments mycéliens est plus fin que celui des champignons.

Les actinobactéries représentent un groupe de bactéries à Gram positif, représentant une grande variabilité morphologique et possédant un taux élevé en guanine et cytosine (G+C% supérieur ou égal à 55%) (Ludwing et al., 2012). Ils sont caractérisés pour la plupart par la formation des hyphes filamenteux produisant des spores asexuées assurant le démarrage d'un nouveau cycle de vie (Prescott et al., 2013).

Sur le plan taxonomique, les données de la biologie moléculaire (notamment le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S) classent actuellement les actinobactéries dans le règne des *Prokaryotae*, phylum des *Actinobacteria*, classe des *Actinobacteria* regroupant quinze ordres (ex : *Actinomycetales*, *Streptomycetales*, *Streptosporangiales*, *Micromonosporales*, *Micrococcales*, etc) (Goodfellow et al., in Bergey's Manual, 2012).

### 2. Ecologie et habitat des actinobactéries

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels et les biotopes particulièrement dans les sols. En effet, environ 10 à 20% des microorganismes telluriques sont des actinobactéries (Dommergues et Mangenot, 1970 ; Ishizawa et Araragi, 1976). On les retrouve dans les glaciers polaires, les sols désertiques chauds et secs, les sols contaminés par des métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins ou salés (Lechevalier, 1981 ; Okoro et Brown et al., 2009 ; Jiang et al., 2013).

Les actinobactéries peuvent vivre à l'état libre ou en symbiose avec des plantes non légumineuses comme le genre *Frankia* (fixation de l'azote atmosphérique) (Verma et al., 2009) ou endophte

dans les tissus de plantes stimulant ainsi leur croissance (Doubou et *al.*, 1998 ; Zhao et *al.*, 2011) ou encore dans les invertébrés marins (Salomon et *al.*, 2004).

Les actinobactéries ont également été isolés des composts (Song et *al.*, 2001) . Plusieurs genres tels que *Thermoactinomyces*, *Sacharomonospora* et *Pseudonocadia* sont actifs dans les derniers stades du compostage en attaquant les structures les plus résistantes comme la cellulose, l'hémicellulose et la lignine grâce à leur arsenal enzymatique diversifié (Song et *al.*, 2001 ; Zermane, 2007).

### **2.1. Les actinobactéries dans le sol**

Les actinobactéries sont largement répandus dans tous les sols y compris ceux exposés à des conditions extrêmes comme la sécheresse et la haute température des sols sahariens algériens (Sabaou et *al.*, 1980, 1992 et 1998). Ils sont présents dans les sols avec une densité de l'ordre du  $10^6$  à  $10^9$  UFC par gramme de sol sec (Goodfellow et Williams, 1983). Le genre *Streptomyces* est largement répandu et représente entre 80 et 95 % des isolats actinobactériens d'origine tellurique (Lechevalier et lechevalier, 1970). Leur nombre diminue avec la profondeur mais leur proportion par rapport à la microflore augmente et reste dominante (Mokrane et *al.*, 2013).

Les actinobactéries produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur d'humus caractéristique des sols (Omura, 1992 ; Zaitlin et *al.*, 2003).

### **2.2. Les actinobactéries dans les milieux marins**

Les actinobactéries sont également représentés dans ces milieux. C'est essentiellement dans les sédiments des fonds fluviaux ou lacustres que ceux-ci sont présents où ils jouent un rôle important dans la décomposition des débris végétaux et donnent à l'eau son odeur de terre. Plusieurs travaux ont montré l'originalité et le potentiel de sécrétion de molécules bioactives des actinobactéries aquatiques (Feling et *al.*, 2003 ; Subramani et Aalbersberg, 2012 ; Mellouk et *al.*, 2016).

## **3. Pouvoir pathogène des actinobactéries**

Les actinobactéries sont en majorité saprophytes mais quelques formes sont pathogènes pour l'homme, les plantes et les animaux.

Les deux principales maladies d'origine actinobactérienne qui touchent à l'homme sont causées par *Mycobacterium tuberculosis* (tuberculose humaine) et *Mycobacterium leprae* (la lèpre).

D'autres actinobactérioses peuvent être causées par des espèces d'*Actinomyces*, *Actinomadura* et *Nocardia*. La nocardiose est due surtout touche de manière particulière aux patients immunodéprimés. D'autres actinobactéries peuvent être responsables d'allergies (Mc Neil et Brown, 1994).

Très peu de maladie de plantes sont provoquées par les actinobactéries. Nous notons par exemple la gale de la pomme de terre causée par *Streptomyces scabies* (Mizuno et Yoshida, 1993).

#### 4. Intérêt des actinobactéries

Si quelques espèces d'actinobactéries sont pathogènes, la majorité d'entre eux sont cependant très utiles. Ce sont des producteurs de nombreuses molécules bioactives dans divers domaines.

Dans le domaine médical et pharmaceutique, les actinobactéries sortent du lot par leur potentialités à produire notamment les molécules antibiotiques et de nombreux composés tels que les antiviraux, les antitumoraux, les immunostimulants, les immunosuppresseurs, vitamines, etc. (Demain, 1999; Takahashi et Omura, 2003; Solanki et kahana et *al.*, 2008 ; Jose et Jebakumar, 2013)

Dans le domaine agronomique, les actinobactéries jouent un rôle très important en recyclant des nutriments grâce à leur arsenal enzymatique capable de dégrader des composés organiques et des polymères très complexes tels que la chitine et les lignocelluloses (Pizzul, 2006 ; Zaitlin et Watson, 2006) contribuant ainsi à la fertilisation des sols. Les actinobactéries sont utilisées dans le biocontrôle de certaines maladies de plantes contre certains agents phytopathogènes tels que *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* et *Pythium* (Toumatia et *al.*, 2016 ; Zamoum et *al.*, 2017).

La fixation d'azote atmosphérique par le genre *Frankia* vivant en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres est également un des exemples importants (Zaitlin et Watson, 2006).

Les actinobactéries ont également un rôle écologique important, comme par exemple dans la dégradation des hydrocarbures (Essien et Udosen, 2000) et la minéralisation du phénol et des déchets industriels (Bhatena et *al.*, 2002).

## **II. IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIES**

La taxonomie des actinobactéries est basée sur plusieurs caractéristiques. Traditionnellement, l'identification du genre se fait sur la base des caractéristiques morphologiques (macro et micro-morphologie) et chimiques (analyse des constituants cellulaires) alors que l'identification de l'espèce se fait sur la base l'étude physiologique et moléculaire (séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S et hybridation ADN-ADN).

Actuellement, les chercheurs ont tendance à faire une identification présomptive du genre basée uniquement sur les données morphologiques, notamment micromorphologiques et réaliser ensuite directement une analyse phylogénétique basée sur le séquençage de l'ADN16S. Une étude complémentaire par des tests physiologiques et chimiques pourra être faite uniquement pour un nombre réduit d'isolats, notamment pour celles qui se révèlent être de nouvelles espèces étant donné que ces caractéristiques sont exigées pour pouvoir publier une nouvelle espèce.

### **1. Etude macro-morphologique**

Les principaux caractères ont pour objet de déterminer la présence, l'abondance et la couleur du mycélium aérien (MA), du mycélium de substrat (MS) et la production (ou non) ainsi que la couleur des pigments diffusibles sur les milieux de culture. Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

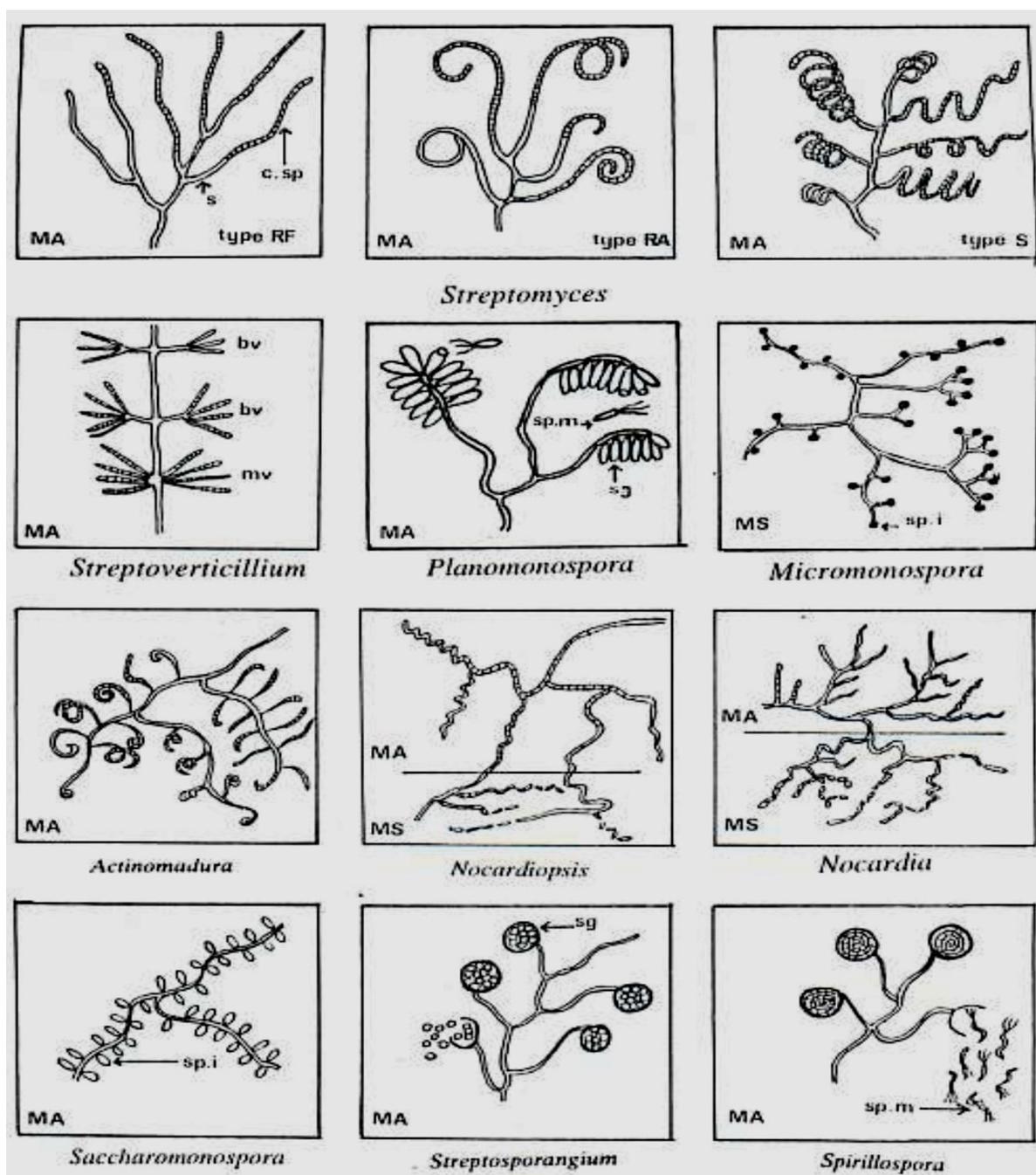
### **2. Etude micro-morphologique**

Cette étude est basée sur l'observation au microscope photonique des actinobactéries cultivées directement sur les milieux gélosés. L'observation microscopique consiste à déterminer si les mycéliums aérien et de substrat sont fragmentés ou pas, signaler la présence des spores, leur mobilité, leur position sur les hyphes (sessiles ou portées par un sporophore) ainsi que et la forme des chaînes de spores (droites, en boucle ou spiralées) (Figure 01).

La présence de certaines structures particulières telles que les sporanges (portés par des sporangiophores), les synnemata et les sclérotés doivent aussi être signalées.

### **3. Etude chimio-taxonomique**

Les critères chimiques consistent en la détermination de la composition pariétale en acides aminés, la composition cellulaire en sucres et la composition membranaire et pariétale en lipides.



**Figure 01.** : Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries (Sabaou, 1988).

MA, mycélium aérien; MS, mycélium du substrat; RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); RA, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); S, *Spira* (chaînes spiralées); s, sporophore; c. sp.; chaînes de spores; sp. i.; spores isolées; sp. m.; spores mobiles; sg., sporanges.

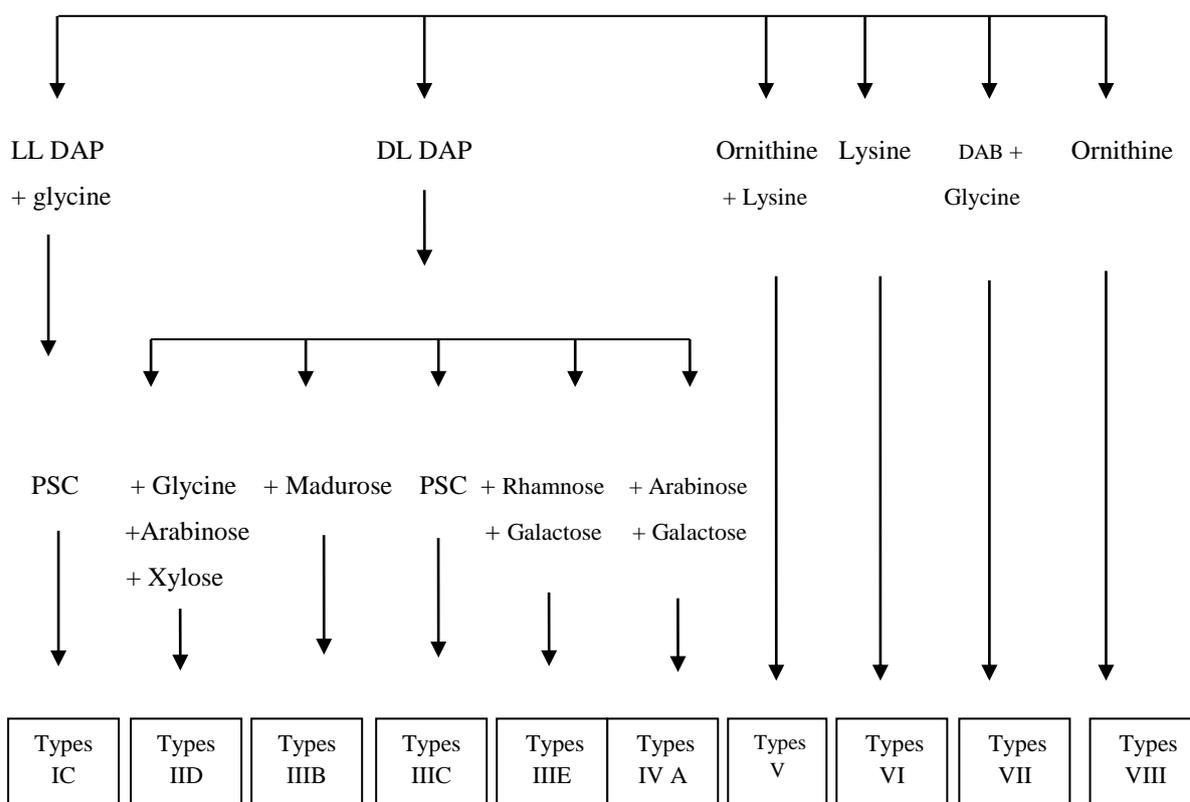
### 3.1. Composition pariétale en acides aminés

Il s'agit de déterminer la forme isomérique de l'acide diaminopimélique (DAP) qui peut être sous forme LL ou DL (méso). Parfois, le DAP est remplacé par la lysine, l'ornithine ou l'acide diaminobutyrique. La présence de la glycine est aussi un élément important taxonomiquement (présent par exemple chez *Streptomyces*) (Holt *et al.*, 1994).

### 3.2. Composition en glucides cellulaires

Les sucres considérés comme importants taxonomiquement sont les couples « arabinose-galactose », « xylose-arabinose » et « rhamnose-galactose » ou encore le madurose, lesquels caractérisent certains genres (Lechevalier et Lechevalier, 1970a).

Plusieurs chimiotypes de parois cellulaires, basés sur la composition cellulaire en acides aminés et en sucres, existent (Becker *et al.* (1964 et 1965) ; Lechevalier et Lechevalier (1970a,b) (Figure 2).



**Figure 2:** Différents chimiotypes rencontrés chez les actinobactéries (adaptée selon Holt *et al.*, 1994).

PSC : pas de sucres caractéristiques. Les actinobactéries ayant les chimiotypes V, VI, VII et VIII ne produisent pas un véritable mycélium. Ils se présentent sous forme de cellules en bâtonnets ou coccoïdes, ou parfois avec un mycélium très rudimentaire. DAP : acide diaminopimélique. DAB = acide diaminobutyrique.

### 3.3. Composition membranaire et pariétale en lipides

Les chimiotypes basés sur la composition en sucres et en acides aminés ne permettent pas de distinguer certains genres rares ayant le même chimiotype. Leur distinction repose sur d'autres analyses chimiques relatives à la composition de la membrane et de la paroi en lipides. Ces lipides taxonomiquement importants sont la phosphatidyl éthanolamine, la phosphatidyl choline, les phospholipides avec glucosamine et la phosphatidyl glycérol. La phosphatidyl-inositol est présente chez tous les actinobactéries (Lechevalier *et al.*, 1977). Selon la composition en phospholipides 5 types de phospholipides, de PI à PV existent (Tableau 01)

**Tableau 01.** Différents types de phospholipides membranaires (Lechevalier *et al.*, 1977).

| Types de phospholipides | Phosphatidyl éthanolamine | Phosphatidyl Choline | Phospholipides avec glucosamine | Phosphatidyl glycérol |
|-------------------------|---------------------------|----------------------|---------------------------------|-----------------------|
| <b>PI</b>               | -                         | -                    | -                               | V                     |
| <b>PII</b>              | +                         | -                    | -                               | -                     |
| <b>PIII</b>             | -                         | +                    | -                               | V                     |
| <b>PIV</b>              | +                         | -                    | +                               | V                     |
| <b>PV</b>               | -                         | -                    | +                               | +                     |

+, présent. – absent. V : variable selon les souches et espèces.

## 4. Etude physiologique

Cela consiste à utiliser un grand nombre de caractères physiologiques et biochimiques qui se résument en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques, protidiques ou autres composés organiques (caséine, gélatine, Tween 80, etc.).

D'autres tests consistent à tester la résistance aux différents agents chimiques et antibiotiques, la tolérance aux conditions extrêmes (température, pH, salinité).

## 5. Etude phylogénétique

Hormis quelques techniques phénotypiques récentes révolutionnaires et moléculaires telle que la spectrométrie Maldi-Tof, l'identification des espèces par les caractéristiques taxonomiques phénotypiques classiques n'est pas précise.

Depuis que la biologie moléculaire a fait son apparition, les tests de routine (morphologie) commencent lentement à être remplacés par des techniques moléculaires plus fiables et rapides qui ont permis de regrouper ou de séparer des espèces entre elles, ou de fusionner des genres entre eux (Ventura, Canchaya et *al.*, 2007 ; Wellington et Ul-Hassan, 2009 ; Bergey's Manual, 2012).

Les principales techniques moléculaires utilisées pour l'identification des actinomycètes sont le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S, l'hybridation ADN-ADN.

### 5.1. Séquençage du gène codant pour l'ARN 16S

Stackebrandt et ses collaborateurs (1981, 1983), ont été les premiers à utiliser cette technique pour la taxonomie des actinobactéries. Le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un gène chromosomique d'une taille de 1500 paires de bases, présent chez toutes les bactéries.

L'étude de l'ADNr 16S, utilise deux techniques de base : la PCR (Polymérase Chain Réaction) et le séquençage. Après extraction de génome entier, la partie de l'ADN génomique codant pour l'ARN ribosomique 16S est amplifiée avant qu'il ne soit séquencé. Les séquences obtenues sont soumises à des études de comparaisons avec celles disponibles dans les bases de données génomiques. Ces études sont effectuées grâce à la disponibilité de plusieurs méthodes de calcul illustrées dans le web sous forme de programmes informatisés (Philip, Clustal W, etc.) (Stackebrandt et al., 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000).

### 5.2. Hybridation ADN-ADN

Le principe de cette étude est de déterminer le taux de ressemblance entre deux espèces selon le taux de réassociation de leurs fragments d'ADN. Pour pouvoir dire que deux souches appartiennent à une même espèce, il faudrait que le pourcentage d'hybridation ADN-ADN soit supérieur ou égal à 70% (Wayne et al., 1987; Wellington et Ul-Hassan, 2009).

### III. LES ANTIBIOTIQUES

#### 1. Historique et intérêt de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire qui ont été particulièrement étudiées du fait de leur importance en thérapie humaine et vétérinaire. L'âge d'or dans la découverte des antibiotiques a été la période des années 1940 - 1960 (Sherk, 2000 ; Coates et Hu, 2007) et la lutte contre les maladies infectieuses a pris alors une importance pour atteindre son apogée au cours des années 70. Les programmes de recherche des nouveaux antibiotiques a fortement ralenti par la suite. A partir des années 80, l'apparition de nouvelles maladies et l'émergence du phénomène de la multirésistance aux antibiotiques, ont suscité de nouveau le besoin de rechercher de nouvelles molécules antibiotiques originales. A partir des années 90, la découverte de nouvelles molécules à propriété antibiotique a commencé à se raréfier même si plusieurs composés bioactifs d'origine microbienne ont été découverts mais la majorité se sont révélés être des analogues de molécules déjà connues (Berdy, 2005).

Actuellement, face au phénomène de la multirésistance des microorganismes pathogènes aux antibiotiques qui ne cesse malheureusement de progresser et continue de causer de véritables échecs thérapeutiques en Algérie et dans le monde (Paterson, 2006; Touati, 2006; Touati *et al.*, 2006; Aggoune-Khinache *et al.*, 2008; Messai *et al.*, 2008; Okesola et Makanjuola, 2009 ; Nordmann *et al.*, 2011), la recherche perpétuelle de nouvelles molécules antibiotiques doit être la priorité des chercheurs et cliniciens dans le monde.

#### 2. Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Le genre *Streptomyces* est le producteur du plus grand nombre de molécules actives connues, soit 80% des antibiotiques d'origine actinobactérienne (Demain, 2006; Jose *et al.*, 2011 ; Solecka *et al.*, 2012). Par ailleurs, beaucoup d'autres genres d'actinobactéries comme *Saccharothrix*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis*, *Streptosporangium*, etc., ont déjà montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes (Flatt *et al.*, 2013; Nakae *et al.*, 2013).

Concernant les bactéries non mycéliennes, les *Bacillaceae* (ex.: *Bacillus subtilis*, *Bacillus thuringiensis*) et les *Pseudomonadaceae* (ex.: *Pseudomonas*) occupent une place très importante suivis par d'autres genres tels que *Micrococcus*, *Proteus*, *Chromobacterium* (Solecka *et al.*, 2012),.

Au cours de ces dernières années, le nombre de champignons producteurs d'antibiotiques a augmenté en passant de 10% (Breton et al., 1989; Sanglier, 1990) aux environs de 38% (Solecka et al., 2012). La plupart des champignons producteurs de molécules bioactives sont des ascomycètes ou des formes imparfaites telles qu'*Aspergillus*, *Penicillium*, et *Fusarium* (Barrett, 2002).

### 3. Classification des antibiotiques

#### 3.1. Classification basée sur la structure chimique

Selon la structure chimique, Berdy *et al.* (1987) et Berdy, (2005), ont classé les antibiotiques en neuf grandes familles. Le Tableau 02 regroupe ces 9 grandes familles, ainsi que leur sous familles. Ce genre de classification mettant à l'écart tout intérêt thérapeutique, c'est pour cela que d'autres types de classifications utilisées dans le domaine clinique existent. Ainsi la famille des  $\beta$ -lactames regroupe tous les antibiotiques ayant un cycle  $\beta$ -lactame.

#### 3.2. Autres types de classification

Le spectre d'action, le type d'action, le mode d'action, l'origine de l'antibiotique ou la charge électrique, sont d'autres types de classification utilisés dans le domaine pharmaceutique et surtout le domaine médical où la classification chimique importe peu.

Selon leur spectre d'action, les antibiotiques peuvent avoir un large spectre (ex: tétracyclines), moyen (ex: érythromycine) ou très étroit (ex: novobiocine).

Selon le type d'action, les antibiotiques sont classés en bactéricides ou fongicides (tuent les microorganismes) et bactériostatiques ou fongistatiques (inhibent la croissance des microorganismes sans les tuer).

Selon le mode d'action c.à.d. la molécule cible sur laquelle les antibiotiques agissent, ceux-ci ont été classés en plusieurs groupes (inhibition de la synthèse de la paroi, inhibition de la synthèse protéique inhibition de la synthèse de l'ADN).

Les antibiotiques peuvent être d'origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique. Ceux qui sont d'origine naturelle sont élaborés par divers organismes vivants. Ils peuvent être d'origine fongique (pénicillines), bactérienne (bacitracine) ou actinobactérienne, ou encore végétale.

Les antibiotiques peuvent être à caractère acide (ex: pénicilline), basique (ex: aminosides) ou neutre (nogalamycines, mutactimycines) (Berdy *et al.*, 1987; Lamari, 2006).

**Tableau 2 :** Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy, 2005).

| Familles d'antibiotiques |                           | Sous-familles                                | Exemples   |
|--------------------------|---------------------------|--|--|
| 1                        | Glucides et apparentés    | Glucides purs                                | Nojirimycine   |
|                          |                           | Aminoglycosides                              | Streptomycine, gentamicine, kanamycine.                      |
|                          |                           | Glycosides                                   | C-glycosides: vancomycine.<br>N-glycosides: streptothricine. |
|                          |                           | Glycolipides.                                | Moenomycine.   |
| 2                        | Lactones macrocycliques   | Macrolides                                   | Spiramycine, érythromycine                                   |
|                          |                           | Polyènes                                     | Amphotéricine, nystatine, candicidine.                       |
|                          |                           | Macrotétrolides                              | Tetranactine, nonactine.                                     |
|                          |                           | Macrolactames.                               | Rifamycine   |
| 3                        | Quinones et apparentés    | Polycycliques accolés<br>Linéairement        | Tétracyclines.   |
|                          |                           | Dérivés naphthoquinoniques                   | Anthracyclines.  |
|                          |                           | Dérivés benzoquinoniques.                    | Mitomycine.  |
| 4                        | Acides aminés et peptides | Dérivés d'acides aminés                      | Cyclosérine, pénicilline, nocardicine.                       |
|                          |                           | Homopeptides                                 | Bacitracine, cyclosporine.                                   |
|                          |                           | Hétéropeptides                               | Aculéacine .   |
|                          |                           | Peptolides                                   | Valinomycine   |
| 5                        | Hétérocycles à azote      | Hétérocycles non accolés.                    | Caerulomycine, mildiomycine                                  |
|                          |                           | Hétérocycles accolés                         | Phénazines, herbicidine.                                     |
| 6                        | Hétérocycles à oxygène    | Polyéthers                                   | Monensine, nigéricine  |
| 7                        | Composés alicycliques     | Dérivés du cycloalcane.                      | Cycloheximide  |
|                          |                           | Terpènes                                     | Acide marasmique.  |
|                          |                           | Oligoterpènes                                | Acide fusidique.   |
| 8                        | Aromatiques               | Dérivés benzéniques.                         | Chloramphénicol  |
|                          |                           | Aromatiques à cycles accolés.                | Griséofulvine  |
|                          |                           | Composés non benzéniques.                    | Fusariocine  |
|                          |                           | Autres dérivés aromatiques                   | Novobiocine  |
| 9                        | Aliphatiques              | Dérivés des alcanes.                         | Élaiomycine  |
|                          |                           | Dérivés d'acides carboxyliques               | Cérolénine.  |
|                          |                           | Composés contenant du phosphore ou du soufre | Fosfomycine  |

#### 4. Mécanismes d'action des antibiotiques

Le mode d'action d'un antibiotique dépend de ce dernier. Certains inhibent la synthèse de la paroi, d'autres ont une action sur la membrane plasmique, la synthèse des acides nucléiques ou encore la synthèse protéique.

Les antibiotiques qui inhibent la synthèse pariétale bactérienne (ex.:  $\beta$ -lactamines, glycopeptides, fosfomycine, cyclosérine, etc.), empêchent l'insertion des acides aminés formant le tétrapeptide muréique ou leur insertion au niveau de la muréine. Ceux qui inhibent la synthèse pariétale fongique (ex.: échinocandines) bloquent la synthèse des glucanes pariétaux qui sont des composants essentiels à la paroi cellulaire fongique entraînant ainsi un déséquilibre osmotique, puis la lyse de la cellule fongique (Asselineau et Zalta, 1973; Carle, 2003).

Les antibiotiques ayant une action sur la membrane plasmique peuvent être antibactériens (ex.: polymyxines) en altérant la structure membranaire conduisant à la formation de pores laissant échapper le contenu cellulaire (Prescott, 2013), ou encore antifongique (ex.: amphotéricine B, nystatine, etc.) qui se lie aux stérols nécessaires à l'intégrité de la membrane cellulaire, conduisant ainsi à la formation de pores provoquant une augmentation de la perméabilité avec perte du contenu cytoplasmique, puis la mort de la cellule fongique (Carle, 2003).

Les antibiotiques qui ont une action sur la synthèse des acides nucléiques inhibent l'ARN polymérase (ex.: ansamycines), l'ADN-gyrase (indispensable à l'ouverture de la double hélice et donc à la réplication de la cellule) et la topoisomérase (ex.: quinolones et fluoroquinolones) ou encore la synthèse de l'acide folique nécessaire à la synthèse des acides nucléiques (ex.: sulfamides et triméthoprimé diaminopyridines) (Asselineau et Zalta, 1973).

D'autres antibiotiques inhibent la synthèse protéique bactérienne en agissant sur les ribosomes (ex.: macrolides, tétracyclines, chloramphénicol, etc.). D'autres (ex.: streptomycine) provoquent des erreurs de lecture du code génétique (Asselineau et Zalta, 1973).

#### 5. Mécanisme de résistance aux antibiotiques

Pour survivre, la bactérie échappe à l'action des antibiotiques par plusieurs mécanismes qui sont classés en deux principaux types: les mécanismes non enzymatiques (intrinsèques) et les mécanismes enzymatiques.

##### 5.1. Mécanisme enzymatique

Les bactéries de la famille des *Enterobacteriaceae* produisent plusieurs enzymes inactivant les antibiotiques, telles que *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* qui présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines et aux carboxypénicillines (Cattoir, 2004).

Les bêta-lactamases représentent le mécanisme essentiel de la résistance acquise aux  $\beta$ -lactamines, par un clivage dans le cycle  $\beta$ -lactame. La synthèse d'une ou de plusieurs Bêta-lactamases représente le mécanisme le plus efficace utilisé par les bactéries pour échapper à l'action létale des  $\beta$ -lactamines (Alekhshun et Levy, 2007).

## 5.2. Mécanisme non enzymatique

### 5.2.1. L'imperméabilité

Les bactéries résistent naturellement à plusieurs antibiotiques hydrophiles par l'existence de l'enveloppe externe qui est hydrophobe grâce à son composant lipopolysaccharidique (LPS) présent chez les bactéries à Gram négatif (Cavallo *et al.*, 2004). Des protéines appelées « porines », possédant des canaux centraux, permettent le passage des molécules de petite taille comme les  $\beta$ -lactamines, les aminosides et les phénicolés. Des mutations entraînent des modifications quantitatives ou qualitatives de l'expression des porines, responsables de la résistance acquise à plusieurs familles d'antibiotiques (Carvallo *et al.*, 2004).

### 5.2.2. Système d'efflux

Les bactéries peuvent résister aux antibiotiques par une exportation active grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Ces protéines sont spécifiques d'une classe d'antibiotiques ou de plusieurs classes d'antibiotiques (Poole, 2004). Les gènes encodant les pompes d'efflux spécifiques sont souvent retrouvés sur des éléments génétiques mobiles (plasmides ou transposons), ou sur le chromosome (Butaye *et al.*, 2003; Poole, 2004).

La pompe d'efflux utilisée pour la résistances aux tétracyclines, aux macrolides et au chloramphénicol fonctionne comme un transporteur d'antibiotiques spécifiques qui permet de pomper l'antibiotique hors de la cellule ou de la membrane cellulaire (Sapunaric *et al.*, 2005).

### 5.2.3. Altération des cibles d'antibiotiques

Ce type de mécanisme est souvent utilisé chez *Staphylococcus aureus* et les staphylocoques à coagulase comme un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP (Quincampoix et Mainardi, 2001).

La résistance aux aminoglycosides chez les bactéries à Gram négatif et à Gram positif se fait par la modification de la cible qui est le mécanisme le plus répandu. les enzymes impliquées sont les aminosides acétyltransférases et les aminosides Phosphotransférases (Cavallo *et al.*, 2004).

## Lieu de stage :

Notre étude pratique a été menée durant la période allant du début février - fin avril 2018, au niveau du laboratoire de microbiologie de l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires (E.S.S.A.I.A.) sise à Beau lieu, El Harrach (Alger) sous la supervision du Dr. AOUCHE Adel de l'E.S.S.A.I.A.

Notre étude porte sur l'étude de trois souches d'actinobactéries et elle est divisée en deux volets, une étude taxonomique basée sur une étude morphologique et surtout phylogénétique et une étude du pouvoir antagoniste des actinobactéries vis-à-vis des microorganismes pathogènes et/ou toxigènes pour l'homme et les végétaux.

Ce chapitre se divise en deux grandes parties, la première est consacrée au matériel biologique utilisé (bactéries et champignons filamenteux) et la deuxième partie est réservée aux méthodes et techniques utilisées.

## **I. MATERIEL BIOLOGIQUE**

### **1. Souches d'actinobactéries**

Les souches d'actinobactéries retenues dans notre travail proviennent du laboratoire de Microbiologie (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger). Elles ont été isolées à partir des sols sahariens algériens (Aouiche, 2010). Ces isolats sont les suivants :

- Isolat PA14
- Isolat PA07
- Isolat PA03

La désignation « PA » signifie « palmeraie ». Cela est dû au fait que les échantillons de sol prélevés proviennent des palmeraies de la région de Ghardaïa.

### **2. Microorganismes-cibles**

Les microorganismes-cibles sont des microorganismes contre lesquels on test le pouvoir antagoniste (production d'antibiotiques) des actinobactéries étudiées. Ces microorganismes sont pathogènes et/ou toxigènes pour l'homme et les végétaux.

#### **2.1. Les bactéries-cibles**

Les bactéries-cibles utilisées sont les suivantes:

- Bactéries multi-résistantes aux antibiotiques: *Escherichia coli* (E195), *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) et *Staphylococcus aureus* (Sa).

- Bactérie sensible aux antibiotiques: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633).

La souche *Escherichia coli* provient du Laboratoire de Microbiologie Appliquée de l'Université Abderrahmane Mira de Béjaia. Elle a été isolée au niveau de l'hôpital de Béjaia à partir de patient soumis à une antibiothérapie.

Les souches *Bacillus subtilis* proviennent de l'American Type Culture Collection (ATCC), et *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*, de l'Institut Pasteur d'Alger.

Les profils de résistance de ces bactéries vis-à-vis de plusieurs antibiotiques cliniquement utilisés ou non sont indiqués dans le Tableau 03, ci-dessous.

**Tableau 03.** Profils de résistance aux antibiotiques des bactéries-cibles utilisées.

| Gram    | Microorganismes                      | Résistance à  | Sensibilité à                               |
|---------|--------------------------------------|---|---|
| Négatif | <i>Escherichia coli</i> (E195)       | AMX-AMC-TIC-TCC-MEC-CF-CXM-FOX-CTX-CRO-CAZ          | ND  |
|         | <i>Pseudomonas aeruginosa</i> (Pa)   | GEN-NEO-PEN-CAR-CYC-ERY-SPI-C-SSS                   | K-CHL-OXY-RIF                               |
| Positif | <i>Staphylococcus aureus</i> (Sa)    | GEN-K-NEO-VAN-PEN-C-KAS, -CAR, CYC-BAC-POLB-OLE-SPI | TE-CHR-OXY-VIB.                             |
|         | <i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 6633) | NEO   | GEN-K-VAN-PEN-CAR-CHL-C-OXY-ERY-SPI-RIF-SSS |

AMC: amoxicilline + clavulanate, AMX: amoxicilline, CAR: carbénicilline, CAZ: ceftazidime, C: chloramphénicol, CF: céfalotine, CHL: chlortétracycline, CTX: céfotaxime, CXM: céfuroxime, CYC: cyclosérine, ERY: érythromycine, FOX: céfoxitine, GEN: gentamicine, NEO: néomycine, OXY: oxytétracycline, RIF: rifampicine, PEN: pénicilline G, PIP: pipéracilline, K: kanamycine, SPI: spiramycine, SSS: sulfamide, TCC: ticarcilline + clavulanate, TIC: ticarcilline, VAN: vancomycine, KAS: kasugamycine, BAC: bacitracine, POLB: polymyxine B, OLE: oléandomycine, ND: non déterminé, ATCC: American Type Culture Collection.

\*Source hospitalière.

## 2.2. Les champignons filamenteux

Les champignons filamenteux utilisés proviennent du LBSM de l'ENS de Kouba. Il s'agit de :

- *Fusarium culmorum* (FC).
- *Aspergillus flavus* (AF).
- *Aspergillus carbonarius* (AC).
- *Aspergillus ochraceus* (AO).

- *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 (UR).

Le Tableau 04 ci-dessous indique les concentrations minimales inhibitrices (C.M.I.) des champignons filamenteux-cibles utilisés.

D'après les valeurs des C.M.I., on peut remarquer une résistance assez importante de la majorité des souches au cycloheximide. Le champignon le plus sensible est *Aspergillus carbonarius*.

**Tableau 04 :** Concentrations minimales inhibitrices des champignons filamenteux cibles vis-à-vis de divers composés antifongiques.

| Microorganismes-cibles         | CMI (µg/mL) |      |   |    |     |     |
|--------------------------------|-------------|------|---|----|-----|-----|
|                                | N           | Cyc  | I | Am | Th  | T   |
| <i>Fusarium culmorum</i>       | 5           | 10   | 5 | 5  | 3   | 8   |
| <i>Aspergillus flavus</i>      | 3           | >100 | 1 | 3  | 0.5 | 1   |
| <i>Aspergillus carbonarius</i> | 5           | 5    | 1 | 3  | 0.5 | 0.5 |
| <i>Aspergillus ochraceus</i>   | 8           | 40   | 3 | 3  | 0.5 | 8   |
| <i>Umbelopsis ramanniana</i>   | 8           | 45   | 3 | 4  | 2   | 5   |

**N:** nystatine (97%); **Cyc:** cycloheximide 98% (actidione); **I:** itraconazole (98%); **Am:** amphotéricine B; **Th:** terbinafine hydrochloride; **T:** thioconazole (96,5%).

### 2.3. Milieux de culture

Deux milieux complexes, souvent utilisés pour la production d'antibiotiques (Badji, 2007), ont été choisis lors de cette méthode: l'ISP2 et le Bennett (composition en annexe).

## II. METHODES

### 1. Revivification et purification des souches

Les souches de bactéries et d'actinobactéries sont revivifiées puis purifiées par la méthode des stries sur milieu complexe gélosé ISP2 (voir composition en annexe) en boîte de Pétri. Après purification, les microorganismes sont repiqués sur le même milieu mais coulé en tube incliné, puis conservées à 4 °C pour une utilisation ultérieure.

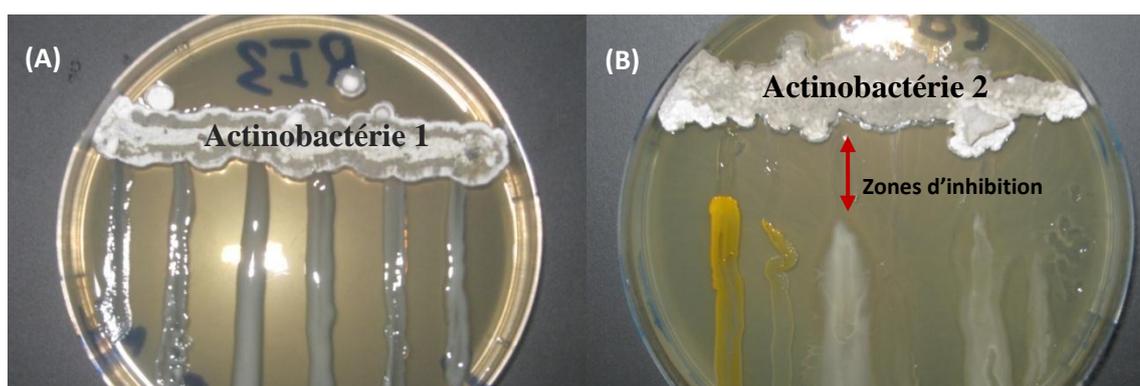
## 2. Activité antibiotique des actinobactéries sur milieux solides

### 2.1. Méthode des stries croisées

La mise en évidence du pouvoir antagoniste (activité antimicrobienne) des actinobactéries contre les microorganismes-cibles est réalisée par la méthode des stries croisées.

La méthode consiste à ensemencer l'actinobactérie sur milieu ISP2 et Bennett en un seul trait en bordure de la boîte de Pétri. Les boîtes sont incubées à une température de 30°C pendant 5 à 7 jours permettant aux souches d'actinobactéries de croître et de sécréter les antibiotiques dans le milieu. Par la suite, les bactéries sont ensemencées en un trait perpendiculaire à celui de l'actinobactérie (figure 03 en ci-dessous).

La lecture des résultats se fait après 24 h pour les bactéries et 48 à 72 h pour les champignons filamenteux en mesurant les zones d'inhibition en millimètre entre la bordure de l'actinobactérie et le microorganisme-cible comme le montre la figure 03.



**Figure03.** Photo illustrant la mise en évidence du pouvoir antagoniste des actinobactéries par la méthode des stries croisées.

Exemples: (A) actinobactérie 1 inactif contre les microorganismes-cibles (pas de zones d'inhibition); (B) actinobactérie 2 actif contre les microorganismes-cibles en inhibant leur croissance (zone d'inhibition).

### 2.2. Cinétiques de production des antibiotiques en milieux solides

Les souches d'actinobactéries ayant montré une bonne activité antimicrobienne sur milieu solide par la méthode des stries croisées, ont fait l'objet d'une cinétique de production des antibiotiques en milieu solide.

Le suivi de la production des antibiotiques sur milieux solides a été réalisé pour l'actinobactérie le plus actif durant 10 jours par la méthode des cylindres d'agar (Shomura et *al.*, 1979) contre les

microorganismes-cibles sélectionnés comme étant les plus sensibles aux antibiotiques produits par l'actinobactérie.

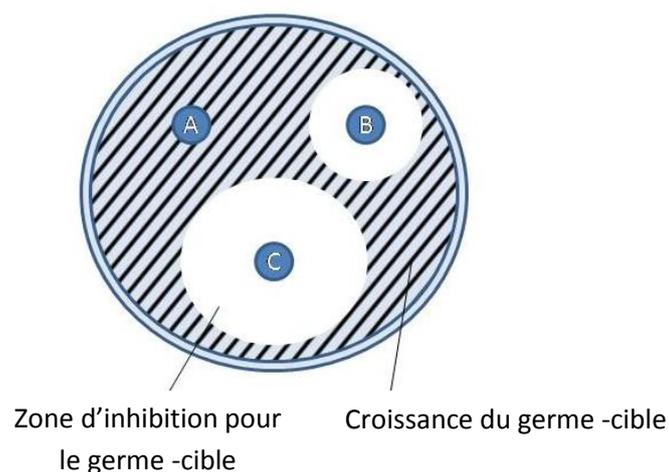
Le milieu de culture choisi pour cultiver l'actinobactérie (ISP2 ou Bennett) pour ces cinétiques est celui ayant favorisé une meilleure production d'antibiotiques par la méthode des stries croisées.

La méthode consiste à ensemencer l'actinobactérie sur milieu de culture solide (ISP2 ou Bennett) et l'incuber à 30 °C pour un suivi de 10 jours. En parallèle, chaque jour ensemencer en masse un volume précis de la suspension de chaque microorganisme-cible (0,5 Mcfarland) dans un milieu de culture (PCA à 12 g/L d'agar) maintenu en surfusion. Homogénéiser le milieu par agitation rotative et couler en boîtes de pétri puis laisser solidifier.

Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre sont prélevés quotidiennement à l'aide d'un emporte-pièce stérile à partir des boîtes de l'actinobactérie pour être déposés aseptiquement à la surface de la gélose PCA (12 g/L) pré-ensemencée par le microorganisme-cible.

Les boîtes sont ensuite mises à 4°C durant 2 heures 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 heures pour les bactéries et 48 heures pour les champignons filamenteux.

L'activité antibiotique est appréciée par la mesure du diamètre des zones d'inhibition qui apparaissent autour des cylindres d'agar. La figure 04 ci-dessous illustre le résultat obtenu par la méthode des cylindres.



**Figure 04.** Schéma illustrant le résultat de l'activité antimicrobienne obtenue par la méthode des cylindres d'agar lors de la cinétique de production des antibiotiques (\*).

A, B et C sont représentés les cylindres d'agar prélevés quotidiennement et aseptiquement de la culture actinobactérienne et déposés sur la gélose semi-solide (12 g/L d'agar) préalablement ensemencée par le germe-cible.

(\*), Source du schéma : <https://wikimedia.org>

### **3. Etude taxonomique des souches d'actinobactérie**

#### **3.1. Etude morphologique**

##### **3.1.1. Etude macro-morphologique**

Cette étude vise à apprécier la croissance de la souche d'actinomycète et à noter la couleur des mycélia aérien et du substrat, ainsi que la production ou non de pigments diffusibles dans le milieu. Ces caractéristiques sont notées après 7 et 14 jours d'incubation à 30 °C sur les milieux ISP2 et Bennett (Shirling et Gottlieb, 1966).

Les couleurs des mycélia aérien et du substrat sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Charts Illustrated with Centroid Color : ISCC-NBS).

##### **3.1.2. Etude micro-morphologique**

L'étude micro-morphologique est essentielle pour la reconnaissance des genres. La souche d'actinobactérie poussant sur les milieux ISP2 et/ou Bennett est observée au microscope optique Zeiss en utilisant les grossissements 10 x 10 et 10 x 40.

Ces observations sont réalisées directement sur la boîte de Pétri de manière à bien repérer les structures en place (sporulation du mycélium aérien, détermination des types de chaînes de spores, fragmentation ou non du mycélium du substrat, la présence ou non de certaines structures).

#### **3.2. Etude Phylogénétique et analyses par outils bioinformatiques**

##### **3.2.1. Origine des séquences de l'ADN codant pour l'ARNr 16S**

Les séquences de l'ADN codant pour l'ARNr 16S ont été fournies par Dr. Aouiche A dans un fichier informatique de type texte. L'extraction de l'ADN, la PCR et le séquençage de ce gène ont été réalisés en collaboration avec l'ENSAT de Toulouse (France) dans le cadre des travaux de recherche du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger) (Aouiche, 2010).

##### **3.2.2. Traitement des séquences par outil bio-informatique**

Il faut d'abord savoir que les séquences de l'ADN codant pour l'ARN 16S obtenues doivent subir un traitement des corrections et un assemblage avant de pouvoir les exploiter et les

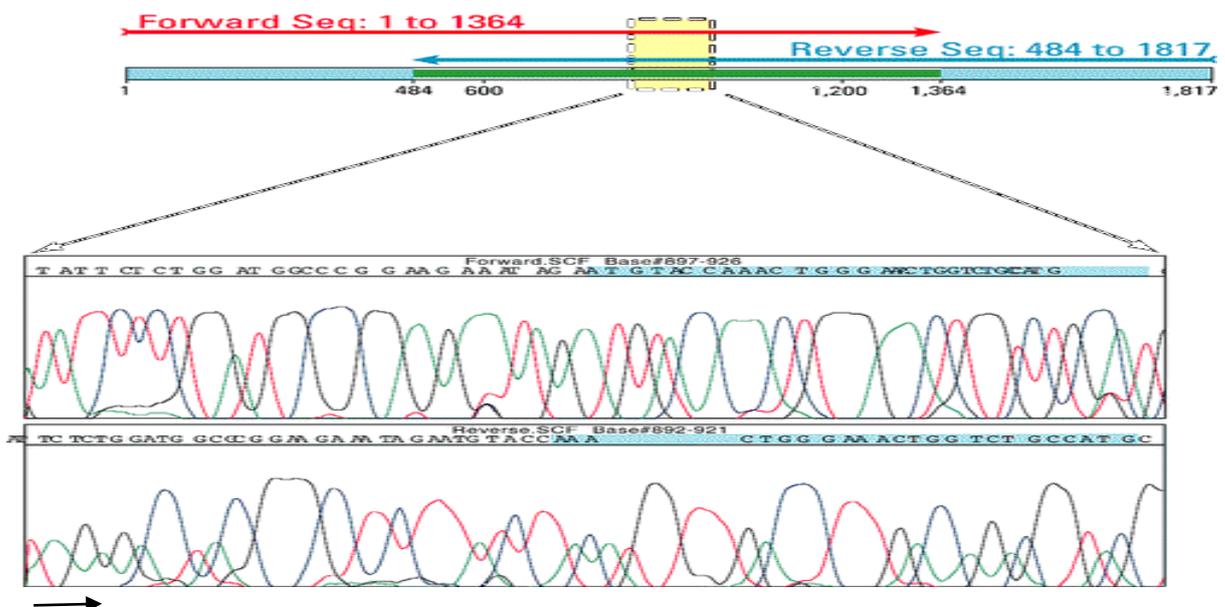
comparer aux séquences de la banque génomique. Tous ces traitements sont réalisés par outils bio-informatiques regroupés dans le logiciel « **MEGA 7** » et la démarche à suivre est détaillée en ci-dessous :

➤ Inversion de la séquence Reverse

Pour comprendre ce premier traitement, il faut savoir que l'amplification de l'ADN codant pour l'ARNr 16S par PCR se fait dans deux directions différentes et en même temps, de façon à obtenir deux séquences complémentaires, une séquence F « Forward » et une séquence R « Reverse » (voir figure 05). Cela est dû au fait de l'incapacité de la Taq polymérase à séquencer d'un coup tout le gène composé d'environ 1500 paires de base (accumulations d'erreurs).

Afin de pouvoir aligner les deux séquences F et R (étape 2) comme il est illustré sur la figure 05 pour déterminer leur partie commune au milieu et compléter ainsi la partie manquante à la séquence F pour obtenir une séquence complète, il est nécessaire d'abord d'inverser la séquence R, car même si l'amplification de la séquence R se fait de droite vers la gauche, le séquenceur fait la lecture et nous donne la séquence de gauche vers la droite (dans le fichier informatique texte fourni).

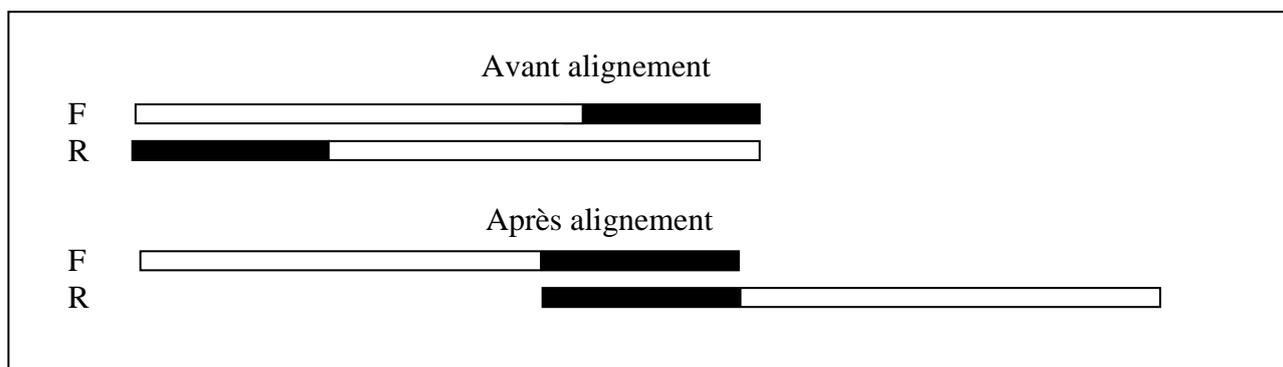
L'inversement de la séquence « R » se fait par le logiciel MEGA 7 en sélectionnant la séquence et en cliquant sur la fonction « reverse complement ».



**Figure 05** : Schéma explicatif représentant la direction des deux séquences Forward et Reverse lors du séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.

➤ Alignement des séquences « F » et « R »

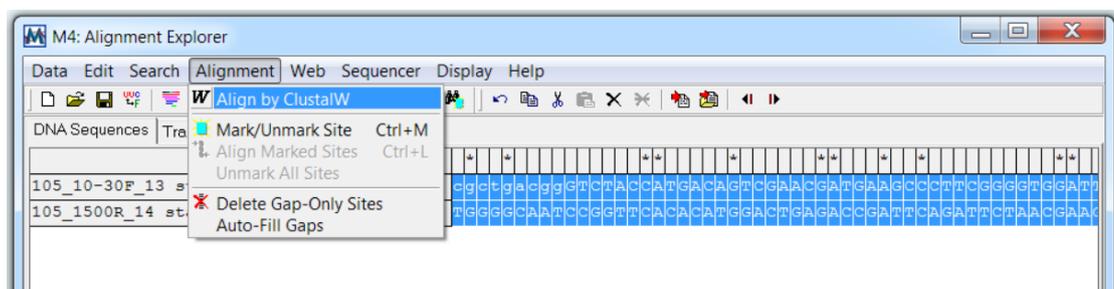
La deuxième étape du traitement consiste à aligner les deux séquences « F » et « R » afin de déterminer la partie commune et pouvoir la suite obtenir une séquence complète de bout en bout (environ 1500 paires de base). Le principe est schématisé en ci-dessous (Figure 06).



**Figure 06** : Schéma explicatif montrant la position des séquences F et R avant et après alignement par logiciel Bio-informatique MEGA 7.

La partie noire des séquences représente la partie commune.

Sur le plan pratique, il suffit de sélectionner les deux séquences au niveau du logiciel MEGA 7 et de cliquer par la suite sur la fonction « Align by ClustalW ».



➤ Élimination et correction des erreurs au niveau de la séquence

Après alignement, la troisième étape consiste à éliminer les erreurs survenues lors de l'amplification de l'ADN par la Taq polymérase. Cela se fait en apportant les corrections suivantes :

- Apporter les corrections en éliminant les erreurs des extrémités (début et fin de la séquence) sachant qu'aux extrémités de chaque séquence, les erreurs s'amplifient.
- Détecter les vides (gaps) et les différences entre les deux séquences F et R dans la partie commune et apporter les correctifs.

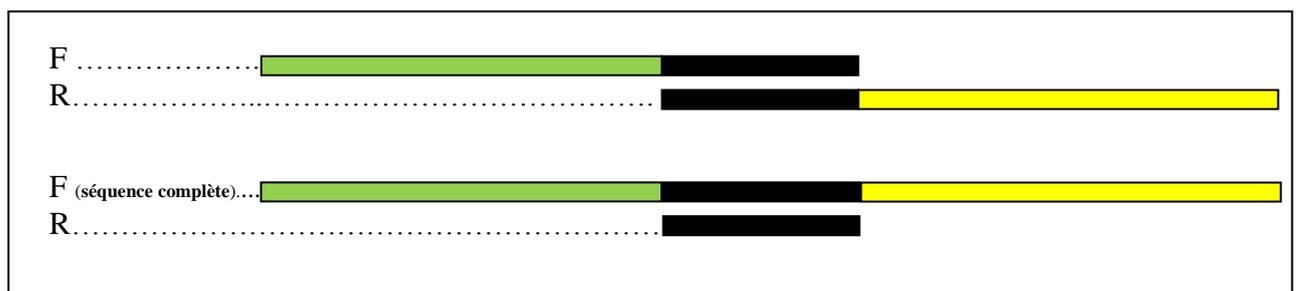
L'exemple suivant illustre un cas pratique d'erreur à rectifier. Plusieurs discordances peuvent être détectées entre les deux séquences de l'exemple ci-dessous. Sachant que la séquence du haut arrive à sa fin, il faut considérer qu'elle cumule beaucoup d'erreurs à ce niveau. Il faudra donc se fier à la séquence du bas qui est relativement au milieu et donc plus fiable.



### ➤ Obtention de la séquence finale complète

Après inversion de la séquence « R », alignement des deux séquences « F » et « R » et apport des corrections des éventuelles erreurs, la séquence complète (environ 1500 paire de base) de l'ADN codant pour l'ARNr 16S pourra être obtenue en coupant la partie non commune de la séquence « R » et en la collant à la séquence « F » (voir schéma explicatif, figure 07).

La séquence complète obtenue pourra être copiée et collée dans un document texte pour la sauvegarder.



**Figure 07** : Schéma explicatif montrant la manière par laquelle la séquence complète de l'ADN codant pour l'ARNr16S est obtenue par logiciel Bio-informatique MEGA 7.

La partie noire des séquences représente la partie commune.

Les segments verts et jaune représentent les parties non communes.

### 3.2.3. Détermination de l'espèce la plus proche par Blast

La séquence complète du gène codant pour l'ARNr 16S est introduite dans la base de données Ez-biocloud (EZtaxon) (<https://www.ezbiocloud.net>) ou NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>) pour une

comparaison avec les séquences ADNr 16S de toutes les espèces connues à ce jour. Les espèces les plus proches sont ainsi déterminées.

Lorsque la séquence d'ADNr 16S présente plus de 98,65 % de similarité avec les espèces les plus proches, seule une hybridation ADN-ADN pour affirmer l'appartenance de l'isolat étudié à cette espèce. Si en revanche, le pourcentage de similarité avec l'espèce la plus proche est inférieur à ce seuil (98,65 %) il est admis directement que l'isolat étudié est une nouvelle espèce (Kim et al., 2014).

### 3.2.4. Construction de l'arbre phylogénétique

L'arbre phylogénétique (Figure 08) représente schématiquement le lien et les distances qui existent entre les différentes espèces. Cela se fait en comparant la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat étudié à celles des espèces les plus proches sélectionnées (dix ou vingt espèces les plus proches ou encore toutes les espèces du genre).

La construction de l'arbre phylogénétique commence par un alignement et suivi par des analyses logarithmiques effectuées par la méthode de Jukes et Cantor (1969) pour le calcul des matrices des distances d'évolution et celle du Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) pour la construction des topologies des arbres phylogénétiques.

La validation statistique des liens phylogénétiques établis entre les espèces est effectuée par le test du Bootstrap (Felsenstein, 1985). Ce dernier consiste à répéter les tests permettant d'établir les nœuds et les liens entre les espèces 1000 fois avant de les valider.

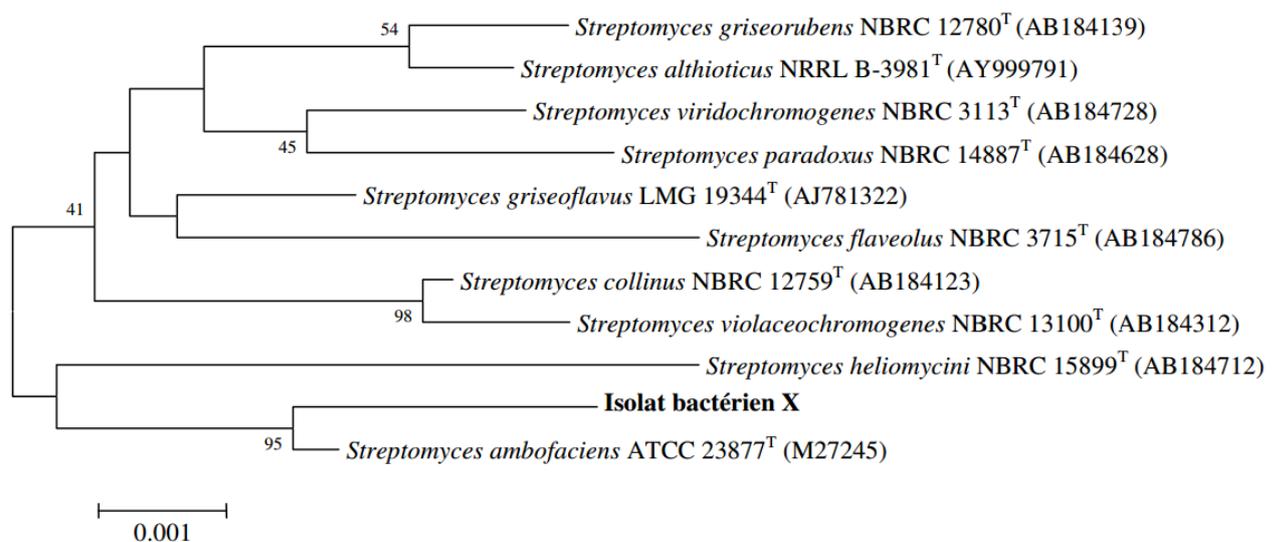


Figure 08 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S, montrant la relation entre l'isolat bactérien X et les souches-types du même genre, en l'occurrence *Streptomyces*. La barre représente une substitution pour 1000 nucléotide (Aouiche et al., 2012).

## I. ETUDE TAXONOMIQUE DES ACTINOBACTÉRIES

Les trois souches d'actinobactéries étudiées ont subi tout d'abord une étude taxonomique basée sur les caractéristiques morphologiques et phylogénétiques.

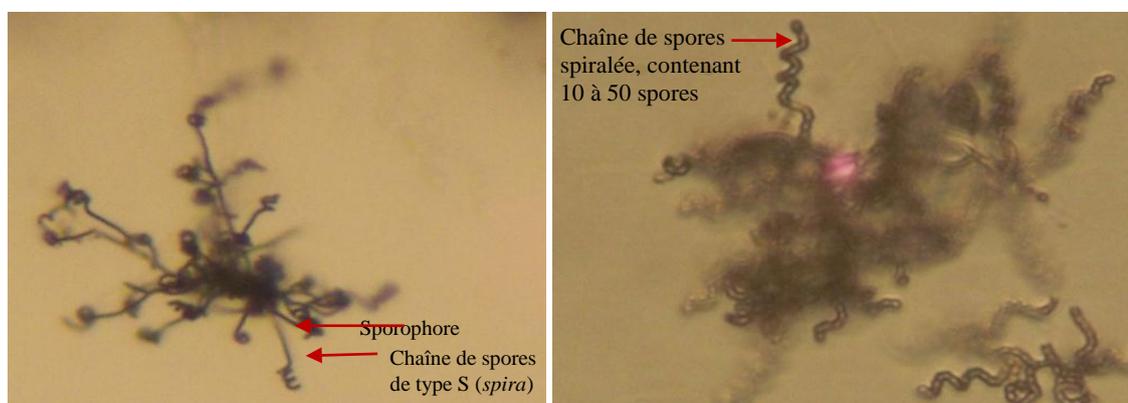
### 1. Caractéristiques macro et micromorphologiques

D'après les caractéristiques macromorphologiques et culturales (Tableau 05) d'une part et micromorphologiques (Figures 09, 10 et 11) d'autre part, les trois souches d'actinobactéries étudiées ont été classées en deux groupes :

**Groupe 1:** Il comprend les isolats PA07 et PA14. Dans ce groupe les deux isolats présentent un mycélium aérien à filaments ramifiés. Il produit des chaînes de spores longues ou courtes, non mobiles, dont chacune est portée par un sporophore. Le mycelium de substrat ne se fragmente pas.

La souche PA14 pousse bien sur milieux ISP2 et Bennett. Le mycélium aérien est produit abondamment et il est de couleur grise. Le mycélium de substrat est brun clair. Des pigments solubles dans le milieu de couleur brune sont produits sur ISP2 et Bennett. La sporulation est abondante. Les chaînes de spores sont plus ou moins longues (10 à 50 spores/chaîne) et de type S (spirales). La micromorphologie de la souche PA14 est illustrée par la Figure 09.

La souche PA07 pousse bien sur les deux milieux utilisés et sa sporulation est bonne. Le mycélium aérien est de couleur jaune pâle à jaune grisâtre et le mycélium de substrat est beige pâle à brun olive clair. Les chaînes de spores (20 à 50 spores/chaîne) sont droites à flexueuses, c'est-à-dire, de type RF (*Rectus Flexibilis*). La micromorphologie de la souche PA07 est illustrée par la Figure 10.



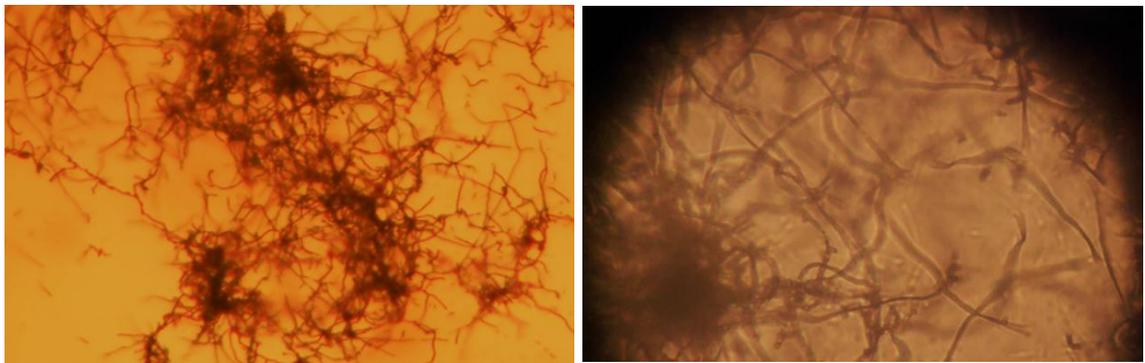
**Figure 09.** Micromorphologie de la souche PA14 poussant sur milieu ISP2, observée au microscope photonique. G (10X10) à gauche et (10X40) à droite.



**Figure 10.** Micromorphologie de la souche PA07 poussant sur milieu ISP2, observée au microscope photonique. G (10x10) à gauche et (10x40) à droite.

**Groupe 2:** Ce groupe comprend l'isolat PA03. Ce dernier présente une très bonne croissance sporulation sur les milieux ISP2 et Bennett utilisés. Le mycélium aérien est blanc à blanc jaunâtre. Le mycélium de substrat est jaune brunâtre à jaune blanchâtre. Aucun pigment soluble n'est produit.

Sur le plan micromorphologique, cet isolat présente des chaînes de spores à filaments qui se fragmentent totalement de manière anarchique en éléments en bâtonnets non mobiles, de type de chaînes de spores droites flexueuses (30 à 50 spores par chaînes). La micromorphologie de la souche PA03 est illustrée par la Figure 11.



**Figure 11.** Micromorphologie de la souche PA03 poussant sur milieu ISP2, observée au microscope photonique. G (10x10) à gauche et (10x40) à droite.

Le tableau 05 résume les caractéristiques culturelles, macromorphologiques des trois souches d'actinobactéries étudiées.

**Tableau 05.** Caractéristiques culturelles des trois souches d'actinobactéries étudiées

| Isolats  |      | ISP2  | Bennett   |
|----------|------|---|---|
| Groupe 1 | PA07 | <b>C : +++</b><br><b>Sporulation : ++</b><br><b>MA : +++</b> , jaune pâle<br>légèrement grisâtre.<br><b>MS : brun clair.</b><br><b>PS : -</b> | <b>C : +++</b><br><b>Sporulation : ++</b><br><b>MA : +++</b> jaune pâle.<br><b>MS : jaune orangé modéré.</b><br><b>PS : -</b> |
|          | PA14 | <b>C : +++</b><br><b>Sporulation : +++</b><br><b>MA : +++</b> , gris.<br><b>MS: brun clair.</b><br><b>PS: brun clair.</b>                     | <b>C : +++</b><br><b>Sporulation : +++</b><br><b>MA : +++</b> , gris.<br><b>MS : brun clair.</b><br><b>PS: brun clair.</b>    |
| Groupe 2 | PA03 | <b>C:+++</b><br><b>Sporulation : ++à +++</b><br><b>MA:++</b> Blanc.<br><b>MS: Jaune brunâtre.</b><br><b>PS: -</b>                             | <b>C:+++</b><br><b>Sporulation : ++à +++</b><br><b>MA:++à+++</b> blanc.<br><b>MS: jaune brunâtre.</b><br><b>PS: -</b>         |

**C:** croissance. **MA:** mycélium aérien. **MS:** mycélium du substrat. **PS:** pigment soluble. +++: abondant. ++: modéré. +: faible. -: inexistant.

## 2. Etude phylogénétique

Après avoir traité les séquences « F » et « R », de l'ADN codant pour l'ARN 16S de chaque souche d'actinobactérie, par logiciel MEGA 7 tel qu'il est explicitement détaillé dans le chapitre matériel et méthodes, nous avons les avons comparées à la banque génomique et nous avons obtenus les résultats suivants :

### 2.1. La souche PA07

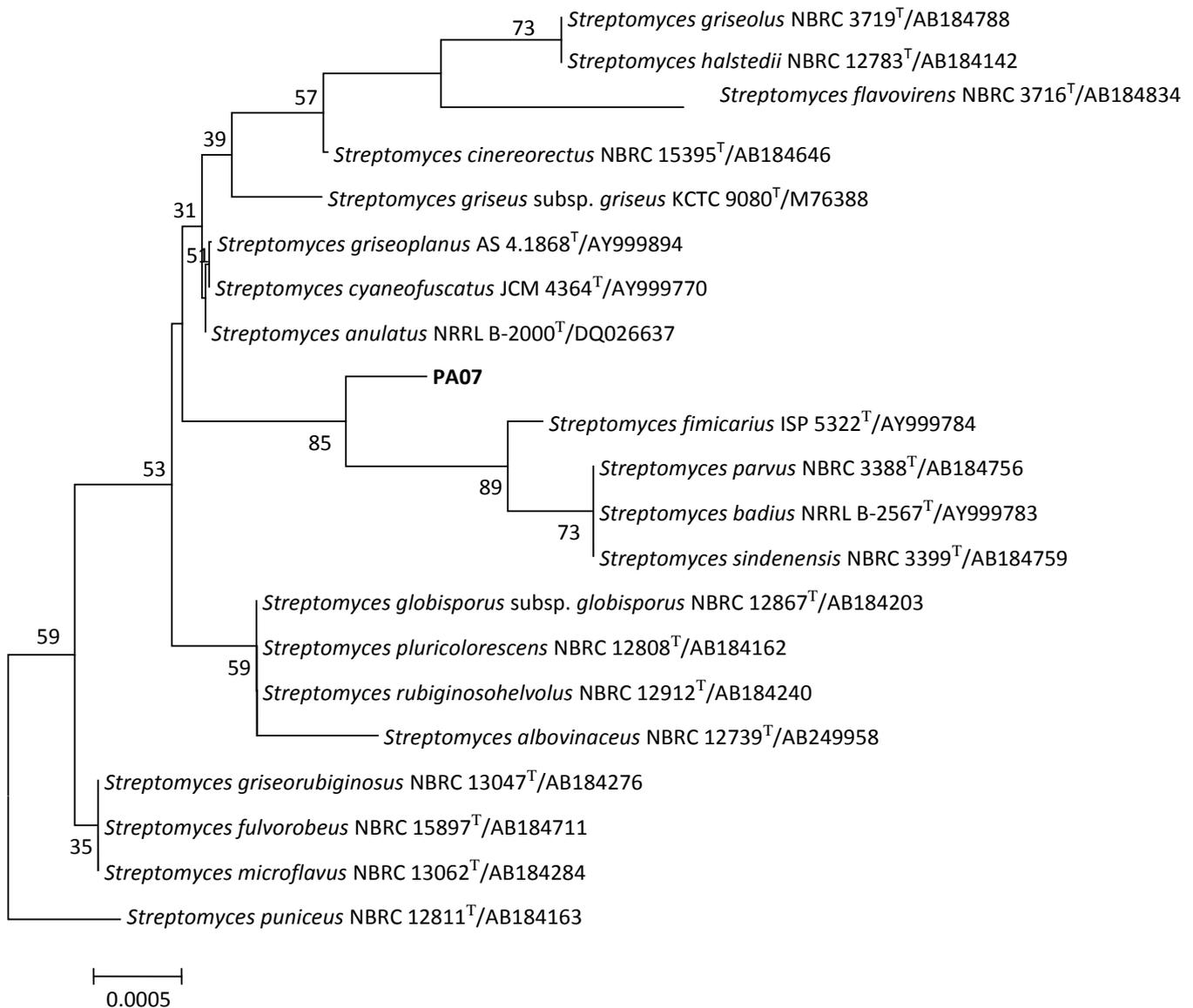
Le séquençage de l'ADNr 16S a permis d'inclure la souche PA07 dans le genre *Streptomyces* (Tableau 06). Les espèces les plus proches sont *S. fimicarius*, *S. anulatus*, *S. cyaneofuscatus* et *S. griseoplanus*, avec 99,5 % de similarité. Les espèces *S. parvus*, *S. badius*, *S. sindenensis* (et autres) sont également proches (99,4 % de similarité).

**Tableau 06.** Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de la souche PA07 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

| N° | Nom d'espèces                                   | Souche-type              | N° de la séquence | % de similarité avec PA07 |
|----|---|--------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1  | <i>Streptomyces fimicarius</i>                  | ISP 5322 <sup>T</sup>    | AY999784          | 99,5                      |
| 2  | <i>S. anulatus</i>                              | NRRL B-2000 <sup>T</sup> | DQ026637          | 99,5                      |
| 3  | <i>S. cyaneofuscatus</i>                        | JCM 4364 <sup>T</sup>    | AY999770          | 99,5                      |
| 4  | <i>S. griseoplanus</i>                          | AS 4.1868 <sup>T</sup>   | AY999894          | 99,5                      |
| 5  | <i>S. parvus</i>                                | NBRC 3388 <sup>T</sup>   | AB184756          | 99,4                      |
| 6  | <i>S. badius</i>                                | NRRL B-2567 <sup>T</sup> | AY999783          | 99,4                      |
| 7  | <i>S. sindenensis</i>                           | NBRC 3399 <sup>T</sup>   | AB184759          | 99,4                      |
| 8  | <i>S. globisporus</i> subsp. <i>globisporus</i> | NBRC 12867 <sup>T</sup>  | AB184203          | 99,4                      |
| 9  | <i>S. pluricologrescens</i>                     | NBRC 12808 <sup>T</sup>  | AB184162          | 99,4                      |
| 10 | <i>S. rubiginosohelvolus</i>                    | NBRC 12912 <sup>T</sup>  | AB184240          | 99,4                      |
| 11 | <i>S. griseorubiginosus</i>                     | NBRC 13047 <sup>T</sup>  | AB184276          | 99,4                      |
| 12 | <i>S. fulvorobeus</i>                           | NBRC 15897 <sup>T</sup>  | AB184711          | 99,4                      |
| 13 | <i>S. microflavus</i>                           | NBRC 13062 <sup>T</sup>  | AB184284          | 99,4                      |
| 14 | <i>S. griseus</i> subsp. <i>griseus</i>         | KCTC 9080 <sup>T</sup>   | M76388            | 99,4                      |
| 15 | <i>S. cinereorectus</i>                         | NBRC 15395 <sup>T</sup>  | AB184646          | 99,4                      |
| 16 | <i>S. albovinaceus</i>                          | NBRC 12739 <sup>T</sup>  | AB249958          | 99,3                      |
| 17 | <i>S. puniceus</i>                              | NBRC 12811 <sup>T</sup>  | AB184163          | 99,3                      |
| 18 | <i>S. halstedii</i>                             | NBRC 12783 <sup>T</sup>  | AB184142          | 99,3                      |
| 19 | <i>S. griseolus</i>                             | NBRC 3719 <sup>T</sup>   | AB184788          | 99,3                      |
| 20 | <i>S. flavovirens</i>                           | NBRC 3716 <sup>T</sup>   | AB184834          | 99,2                      |

**Note:** ne sont données que les espèces de *Streptomyces* les plus proches ayant un pourcentage de similarité supérieur ou égal à 99,2%. <sup>T</sup>: souche-type de l'espèce.

La Figure 12 montre l'arbre phylogénétique de la souche PA07 forme un cluster avec les espèces les plus proches, *Streptomyces fimicarius*, *S. parvus*, *S. badius* et *S. sindenensis*, mais aussi, *S. anulatus*, *S. cyaneofuscatus* et *S. griseoplanus*.



**Figure 12.** Arbre phylogénétique basé sur l’analyse des séquences de l’ADNr 16S et montrant la relation entre PA07 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

**Note:** Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,0005 substitution par position de nucléotide.

## 2.2.- La souche PA14

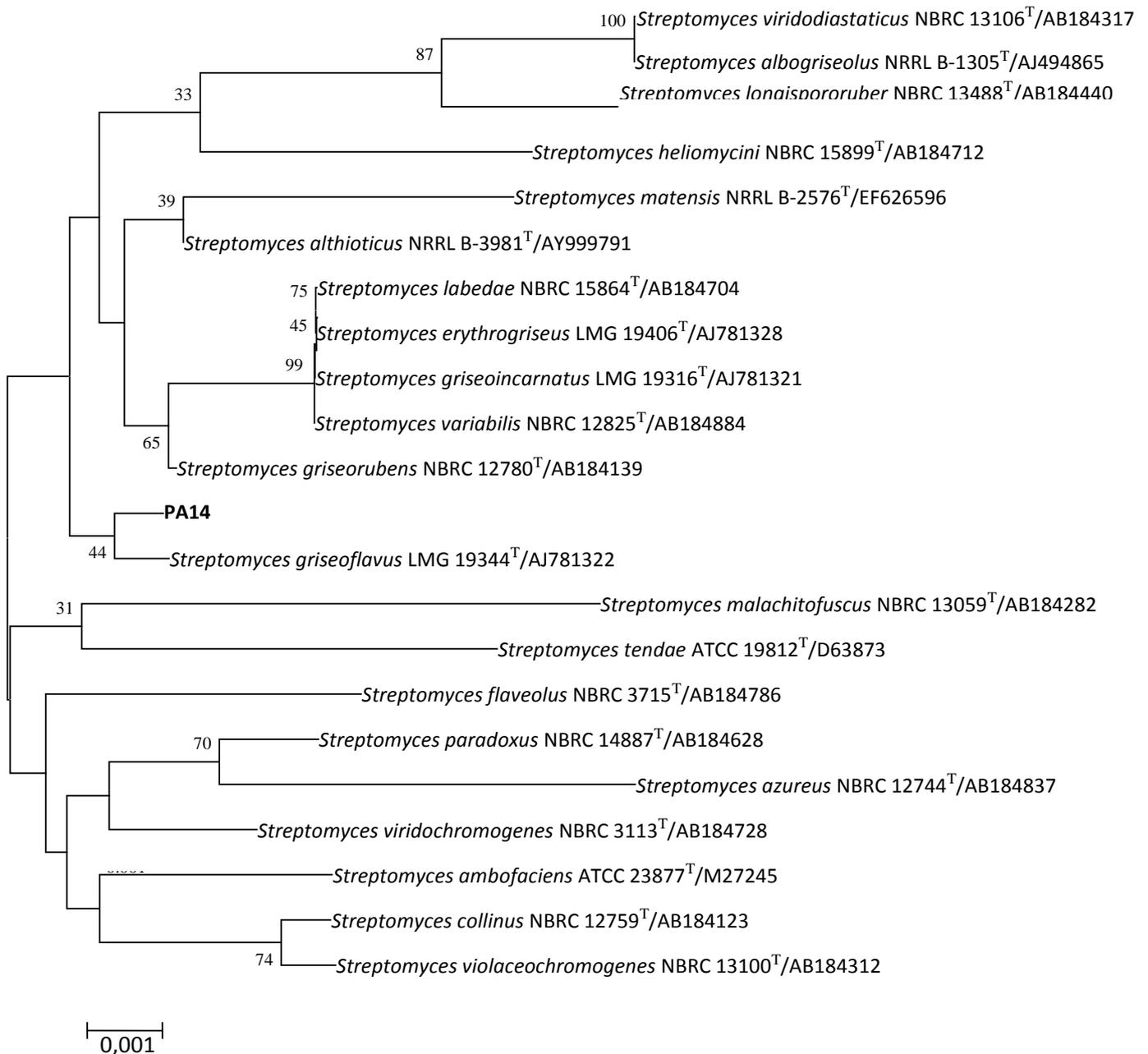
Le séquençage de l’ADNr 16S a permis d’inclure la souche PA14 dans le genre *Streptomyces* (Tableau 07). Les espèces les plus proches sont *S. griseoflavus* et *S. griseorubens*, avec 99,8% de similarité. Cinq autres espèces de *Streptomyces* présentent une similarité de 99,6% avec PA14.

**Tableau 07.** Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de l'isolat PA14 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

| N° | Nom d'espèces                    | Souche-type              | N° de la séquence | % de similarité avec PA14 |
|----|----------------------------------|--------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1  | <i>Streptomyces griseoflavus</i> | LMG 19344 <sup>T</sup>   | AJ781322          | 99,8                      |
| 2  | <i>S. griseorubens</i>           | NBRC 12780 <sup>T</sup>  | AB184139          | 99,8                      |
| 3  | <i>S. althioticus</i>            | NRRL B-3981 <sup>T</sup> | AY999791          | 99,6                      |
| 4  | <i>S. labedae</i>                | NBRC 15864 <sup>T</sup>  | AB184704          | 99,6                      |
| 5  | <i>S. erythrogriseus</i>         | LMG 19406 <sup>T</sup>   | AJ781328          | 99,6                      |
| 6  | <i>S. griseoincarnatus</i>       | LMG 19316 <sup>T</sup>   | AJ781321          | 99,6                      |
| 7  | <i>S. variabilis</i>             | NBRC 12825 <sup>T</sup>  | AB184884          | 99,6                      |
| 8  | <i>S. viridochromogenes</i>      | NBRC 3113 <sup>T</sup>   | AB184728          | 99,5                      |
| 9  | <i>S. paradoxus</i>              | NBRC 14887 <sup>T</sup>  | AB184628          | 99,4                      |
| 10 | <i>S. ambofaciens</i>            | ATCC 23877 <sup>T</sup>  | M27245            | 99,3                      |
| 11 | <i>S. collinus</i>               | NBRC 12759 <sup>T</sup>  | AB184123          | 99,3                      |
| 12 | <i>S. matensis</i>               | NRRL B-2576 <sup>T</sup> | EF626596          | 99,3                      |
| 13 | <i>S. flaveolus</i>              | NBRC 3715 <sup>T</sup>   | AB184786          | 99,2                      |
| 14 | <i>S. violaceochromogenes</i>    | NBRC 13100 <sup>T</sup>  | AB184312          | 99,1                      |
| 15 | <i>S. heliomycini</i>            | NBRC 15899 <sup>T</sup>  | AB184712          | 99,1                      |
| 16 | <i>S. albogriseolus</i>          | NRRL B-1305 <sup>T</sup> | AJ494865          | 99,1                      |
| 17 | <i>S. viridodiastaticus</i>      | NBRC 13106 <sup>T</sup>  | AB184317          | 99,1                      |
| 18 | <i>S. longispororuber</i>        | NBRC 13488 <sup>T</sup>  | AB184440          | 99,0                      |
| 19 | <i>S. malachitofuscus</i>        | NBRC 13059 <sup>T</sup>  | AB184282          | 99,0                      |

**Note:** ne sont données que les espèces de *Streptomyces* les plus proches ayant un pourcentage de similarité supérieur ou égal à 99,0%.

La Figure 13 illustre l'arbre phylogénétique montrant la souche PA14 qui forme un cluster avec l'espèce *Streptomyces griseoflavus*.



**Figure 13.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant la relation entre PA14 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

**Note:** Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,001 substitution par position de nucléotide.

### 2.3.- La souche PA03

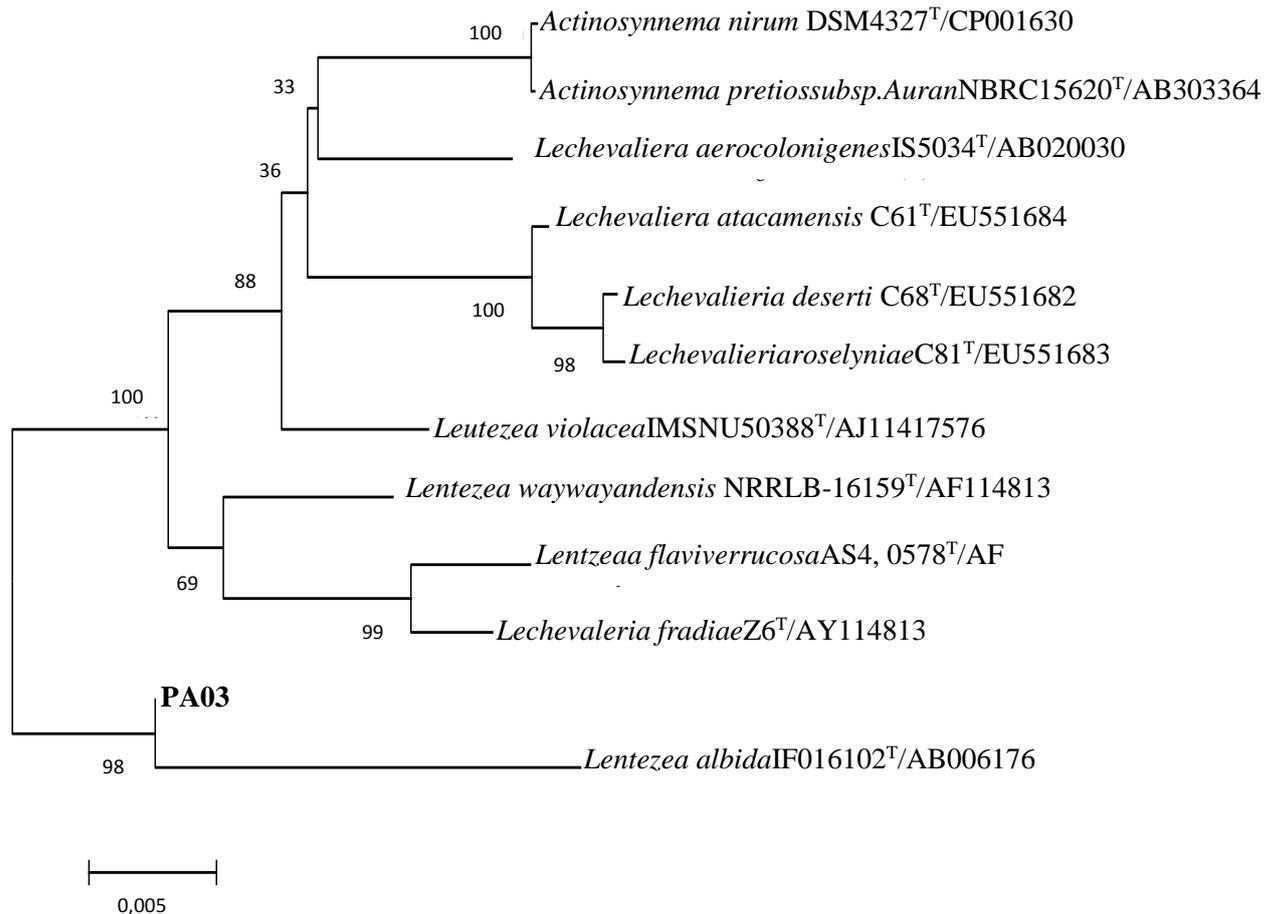
Le séquençage de l'ADNr 16S a permis de rapprocher la souche PA03 aux genres *Lentzea*, *Actinosynnema* et *Lechevaliera* (Tableau 08). L'espèce la plus proche est *Lentzea albida* (99,04%). Les autres espèces présentent une similarité comprise entre 98,06 et 98,87% avec notre isolat.

**Tableau 08.** Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de l'isolat PA03 les souches-types de toutes les espèces des genres *Lentzea*, *Actinosynnema*, *Lechevaliera*.

|    | Nom d'espèces                               | Souche-type               | N° de la Séquence | % de similarité avec PA03 |
|----|---|---------------------------|-------------------|---------------------------|
| 1  | <i>Lentzea albida</i>                       | IFO 16102 <sup>T</sup>    | AB006176          | 99.04                     |
| 2  | <i>Lechevaliera fradiae</i>                 | Z 6 <sup>T</sup>          | AY114813          | 98.87                     |
| 3  | <i>Lentzea flaviverrucosa</i>               | AS4.0578 <sup>T</sup>     | AF183957          | 98.87                     |
| 4  | <i>Lentzea waywayandensis</i>               | NRRL B-16159 <sup>T</sup> | AF114813          | 98.73                     |
| 5  | <i>Actinosynnema mirum</i>                  | DSM 4327 <sup>T</sup>     | CP001630          | 98.57                     |
| 6  | <i>Actinosynnema pretiosum subsp. Auran</i> | NBRC 15620 <sup>T</sup>   | AB303364          | 98.57                     |
| 7  | <i>Lechevaliera aerocolonigenes</i>         | ISP 5034 <sup>T</sup>     | AB020030          | 98.40                     |
| 8  | <i>Lentzea violacea</i>                     | IMSNU 50388 <sup>T</sup>  | AJ114175          | 98.39                     |
| 9  | <i>Lechevaliera atacamensis</i>             | C61 <sup>T</sup>          | EU551684          | 98.08                     |
| 10 | <i>Lechevaliera deserti</i>                 | C68 <sup>T</sup>          | EU551682          | 98.06                     |
| 11 | <i>Lechevaliera roselyniae</i>              | C81 <sup>T</sup>          | EU551683          | 97.49                     |

<sup>T</sup> : souche type

La Figure 14 illustre l'arbre phylogénétique montrant l'isolat PA03 qui forme un cluster avec l'espèce *Leutezea albida*. Les autres espèces sont aussi proche mais avec des degrés moindres.



**Figure 14.** Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S montrant la relation entre PA03 et les souches-types des espèces du genre *Lentezea*, *Actinosynnema* et *Lechevaliera*.

Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages). La barre indique 0,005 substitution par position de nucléotide

### 3. Discussion

#### 3.1. Détermination des genres d'actinobactéries

Lors de l'étude micromorphologique, les trois souches étudiées ont été rattachées de manière présumptive aux genres ou groupe de genres. En effet, la micromorphologie des souches PA07 et PA14 a permis de les rattacher de manière présumptive au genre *Streptomyces*.

L'isolat PA03 possède un mycélium aérien qui se fragmente totalement de manière anarchique en longues chaînes de spores de type droites à flexueuses (RF). Ces caractéristiques morphologiques correspondent à plusieurs genres tels que *Saccharothrix*, *Lentezea*, *Actinosynnema*, *Lechevaliera*, *Nocardia* et *Actinokineospora*.

### 3.2. Détermination des espèces d'actinobactéries

#### 3.2.1. Souche PA03

Le séquençage de l'ADNr 16S a montré que PA03 possède un taux de similarité de 99,04% avec l'espèce *Lentzea albida*. Le Tableau 09 montre une comparaison entre les caractéristiques morphologiques de PA03 avec cette espèce. Notre isolat se distingue de *Lentzea albida* par la couleur du mycélium aérien, la production des pigments et le type de chaînes de spores.

**Tableau 09.** Comparaison des caractères morphologiques de PA03 avec l'espèce la plus proche phylogénétiquement *Lentzea albida* (Hong et al, 1993).

|                   | PA03           | <i>Lentzea albida</i> |
|-------------------|----------------|-----------------------|
| Couleur du MA     | Blanc jaunâtre | Jaune                 |
| Pigments          | Non produits   | Brun jaunâtre         |
| Chaînes de spores | RF             | S                     |

Type **S**: chaîne de spores spiralées. Type **RF**: chaînes de spores droites à flexueuses.

Il faut savoir que plusieurs espèces bien distinctes par l'hybridation ADN-ADN (espèces différentes) peuvent avoir entre elles un taux de similarité de l'ADNr 16S qui avoisine les 100% voire parfois 100%, comme c'est le cas d'*Actinosynnema nirum* et *Actinosynnema pretiosum*. *Lechevaliera atacamensis* et *Lechevalieria deserti*.

Au vu de toutes ces données, la souche PA03 peut donc appartenir soit à *Lentzea albida* soit à une nouvelle espèce de *Lentzea*. Seule l'hybridation ADN-ADN permettra de statuer sur la position taxonomique de cet isolat.

#### 3.2.2. Souche PA14

Les données phylogénétiques basées sur le séquençage de l'ADNr 16S ont permis de rapprocher PA14 de *Streptomyces griseoflavus* et *Streptomyces griseorubens* (Nonomura, 1974; Holt et al., 1994), avec un taux de similarité assez élevé: de 99,8%.

Le Tableau 10 montre une comparaison de la morphologie de PA14 avec ces deux espèces. Les résultats montrent que *S. griseoflavus* est plus proche de notre isolat par rapport à *S. griseorubens* qui présente quelques différences (type de chaînes de spores SRF et chaînes de spores courtes et non production de pigments solubles) avec PA14.

**Tableau 10.** Comparaison des caractères morphologiques de PA14 avec les espèces de *Streptomyces griseoflavus* et *S. griseorubens* les plus proches phylogénétiquement (Nonomura, 1974; Holt *et al.*, 1994).

| Souche/espèce<br>Caractères | PAL114                        | <i>Streptomyces griseoflavus</i> | <i>Streptomyces griseorubens</i> |
|-----------------------------|-------------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Couleur du MA               | Gris                          | Gris                             | Gris                             |
| Pigments solubles           | Produits (brun clair)         | produits                         | Non produits                     |
| Chaînes de spores           | Type S: 10 à 50 spores/chaîne | Type S: 10 à 50 spores/chaîne    | Type SRF: 3 à 10 spores/chaîne   |

Type S: chaîne de spores spiralées ; Type SRF: chaînes de spores spiralées, droites à flexueuses.

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 *Streptomyces viridodiastaticus* et *S. albogriseolus* d'une part, et aussi *S. variabilis*, *S. griseoincarnatus*, *S. erythrogriseus* et *S. labedae* d'autre part (voir arbre phylogénétique de la Figure 13), il est toujours indispensable de compléter l'identification par des études d'hybridation ADN-ADN pour enlever toute ambiguïté. L'isolat PA14 peut donc appartenir soit à l'espèce *S. griseoflavus*, soit à une nouvelle espèce sous réserve du test d'hybridation ADN-ADN.

### 3.2.3. Souche PA07

Le séquençage de l'ADNr 16S a montré que l'isolat PA07 possède un taux de similarité de 99,5% avec sept espèces de *Streptomyces* (les plus proches): *S. fimicarius*, *S. anulatus*, *S. sindenensis*, *S. cyaneofuscus* et *S. griseoplanus*.

Le Tableau 11 montre une comparaison entre les caractéristiques morphologiques de l'isolat PA07 avec ces espèces. Notre isolat se distingue de *S. griseoplanus* (couleur du mycélium aérien, type de chaînes de spores), *S. cyaneofuscatus* (pigments), *S. sindenensis* (couleur du mycélium aérien) et *S. anulatus* (couleur du mycélium aérien et type de chaînes de spores). En revanche, PA07 est similaire à *S. fimicarius* (aucune différence).

Cependant, tout comme cela a été signalé pour PA14, plusieurs espèces de *Streptomyces* bien distinctes par l'hybridation ADN-ADN peuvent avoir entre elles un taux de similarité de l'ADNr 16S de 100%, comme c'est le cas de *S. griseolus* et *S. halstedii*, *S. cyaneofuscus* et *S. anulatus*, *S. parvus*, *S. badius* et *S. sindenensis*, *S. globisporus*, *S. pluricolorescens* et *S. rubiginosohelvolus*, et enfin, *S. griseorubiginosus*, *S. fulvorobeus* et *S. microflavus*. Au vu de toutes ces données, l'isolat PA07 peut donc appartenir soit à *S. fimicarius* soit à une nouvelle espèce de *Streptomyces*. L'hybridation ADN-ADN permettra de statuer sur la position taxonomique de cet isolat.

**Tableau 11.** Comparaison des caractères morphologiques de l'isolat PA07 avec les espèces de *Streptomyces* les plus proches phylogénétiquement (Nonomura, 1974; Holt *et al.*, 1994).

| Souche/espèce            | PA07  | 1     | 2           | 3                  | 4     | 5    |
|--------------------------|-------|-------|-------------|--------------------|-------|------|
| <b>Caractères</b>        |       |       |             |                    |       |      |
| <b>Couleur du MA</b>     | Jaune | Jaune | Jaune-blanc | Blanc, jaune, rose | Jaune | Gris |
| <b>Pigments</b>          | -     | -     | -           | -                  | +     | -    |
| <b>Chaînes de spores</b> | RF    | RF    | SRF         | RF                 | RF    | S    |

**1:** *Streptomyces fimicarius*. **2:** *S. anulatus*. **3:** *S. sindenensis*. **4:** *S. cyaneofuscatus*. **5:** *S. griseoplanus*. **MA:** mycélium aérien. **RF:** *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses). **S:** *Spira* (chaînes de spores spiralées). **SRF:** chaînes de spores spiralées, droites à flexueuses +: test positif. -: test négatif.

En conclusion, nous pouvons dire que PA14 est proche de *Streptomyces griseoflavus*, PA07 de *Streptomyces fimicarius* et PA03 de *Lentzea albida*. Cependant, une hybridation ADN-ADN doit être réalisée pour confirmer leur appartenance à ces espèces ou pour montrer leur originalité.

## II. ACTIVITE ANTAGONISTE DES ACTINOBACTERIES

### 1. Activité antimicrobienne des actinobactéries par méthode des stries croisées

L'activité antimicrobienne des trois souches d'actinobactéries a été testée sur milieux solides ISP2 et Bennett par la technique des stries croisées (Barefoot *et al.*, 1983) après 7 jours d'incubation contre :

- Quatre bactéries dont trois sont multi-résistantes aux antibiotiques. Deux bactéries à Gram négatif : *Escherichia coli* (E195) et *Pseudomonas aeruginosa* (Pa) et deux bactéries à Gram positif : *Staphylococcus aureus* (Sa) et *Bacillus subtilis* (ATCC 6633). La bactérie sensible aux antibiotiques est une bactérie à Gram positif : *Bacillus subtilis* (Bs).

- Cinq champignons filamenteux: *Aspergillus ochraceus* (Ao), *Aspergillus flavus* (Af) ; *Aspergillus carbonarius* (Ac) ; *Fusarium culmorum* (Fc) et *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 (UR).

Les qualificatifs que nous avons attribués à l'activité antimicrobienne obtenue sont les suivants :

- L'activité est considérée comme très importante si le diamètre d'inhibition (DI) est  $\geq$  à 20 mm
- Importante si : 20 mm > DI  $\geq$  15 mm ;
- Moyenne si : 15 mm > DI  $\geq$  10 mm ;
- Faible si : 10 mm > DI  $\geq$  5 mm ;
- Très faible si : DI est inférieur à 5 mm.

Les qualificatifs ci-dessus sont subjectifs et basés sur les travaux du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbien de l'ENS de Kouba (Alger).

Le tableau 12 ci-dessous résume les activités antibactériennes et antifongiques obtenues. Les valeurs représentent les zones d'inhibition exprimées en millimètre.

**Tableau 12 :** Activité antimicrobienne des 03 actinobactéries sur milieux solides ISP2 et Bennett

|      | Milieux | Pa | Ec        | Sa        | Bs | Fc | Ac | Ao | Af | Ur |
|------|---------|----|-----------|-----------|----|----|----|----|----|----|
| PA14 | ISP2    | 10 | 13        | 15        | 12 | -  | -  | -  | -  | -  |
|      | BNT     | 06 | 13        | 10        | 10 | -  | -  | -  | -  | -  |
| PA07 | ISP2    | 12 | <u>20</u> | <u>20</u> | 13 | -  | 12 | -  | -  | 12 |
|      | BNT     | -  | 08        | 07        | 08 | -  | -  | -  | -  | 10 |
| PA03 | ISP2    | 11 | -         | -         | -  | -  | 05 | 05 | -  | -  |
|      | BNT     | 05 | -         | -         | -  | 02 | 05 | 05 | 05 | -  |

ISP2 : International Streptomyces projet 2 ; BNT : Bennett ; Ec : *Escherichia coli* ; Pa : *Pseudomonas aeruginosa* ; Sa : *Staphylococcus aureus* ; Bs : *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) ; Ao : *Aspergillus ochraceus*, Af : *Aspergillus flavus* ; Ac : *Aspergillus carbonarius* ; Fc : *Fusarium culmorum* et Ur : *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 ; - : zone d'inhibition nulle.

En se basant sur les résultats obtenus sur milieux solides (Tableau 12) nous avons retenu les meilleurs milieux de production, à savoir l'ISP2 pour les trois souches étudiées.

### 1.1. Souche PA07

Pour cette souche, nous remarquons une activité à la fois antibactérienne et antifongique. En examinant les zones d'inhibition exprimée en millimètre, nous pouvons qualifier l'activité de cette souche d'importante vis-à-vis d'*Escherichia coli* et *Staphylococcus aureus* (20 mm d'inhibition) et de moyenne vis-à-vis de *Pseudomonas aeruginosa* (12 mm), *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (13 mm), *Aspergillus carbonarius* (12 mm) et *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 (12 mm).

L'activité de cette souche est nettement meilleure sur milieu ISP2.

### 1.2. Souche PA14

Cette souche possède une activité exclusivement antibactérienne sur les milieux de culture utilisés. En examinant les zones d'inhibition, nous pouvons qualifier l'activité de cette souche de moyenne (entre 10 et 15 mm) vis-à-vis de toutes les bactéries-cibles utilisées.

Le meilleur milieu de production des antimicrobiens pour cette souche est le milieu ISP2.

### 1.3. Souche PA03

Pour cette souche l'activité antimicrobienne est de manière générale faible. Elle est dirigée essentiellement contre les champignons filamenteux (antifongique) mais possède aussi une activité antibactérienne (moyenne sur milieu ISP2) dirigée seulement contre *Pseudomonas aeruginosa*. Entre les deux milieux de culture, il n'y a pas une grande différence si ce n'est l'activité antibactérienne qui est nettement meilleure sur milieu ISP2.

## 2. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes

La cinétique de production des activités antimicrobiennes a été réalisée uniquement pour la souche PA07, sélectionnée comme la souche la plus active en se basant sur l'évaluation du potentiel antagoniste effectuée précédemment par méthode des stries croisées.

La cinétique a été suivie durant 10 jours en milieu ISP2 solide par la méthode des cylindres d'agar décrite dans le chapitre matériel et méthodes.

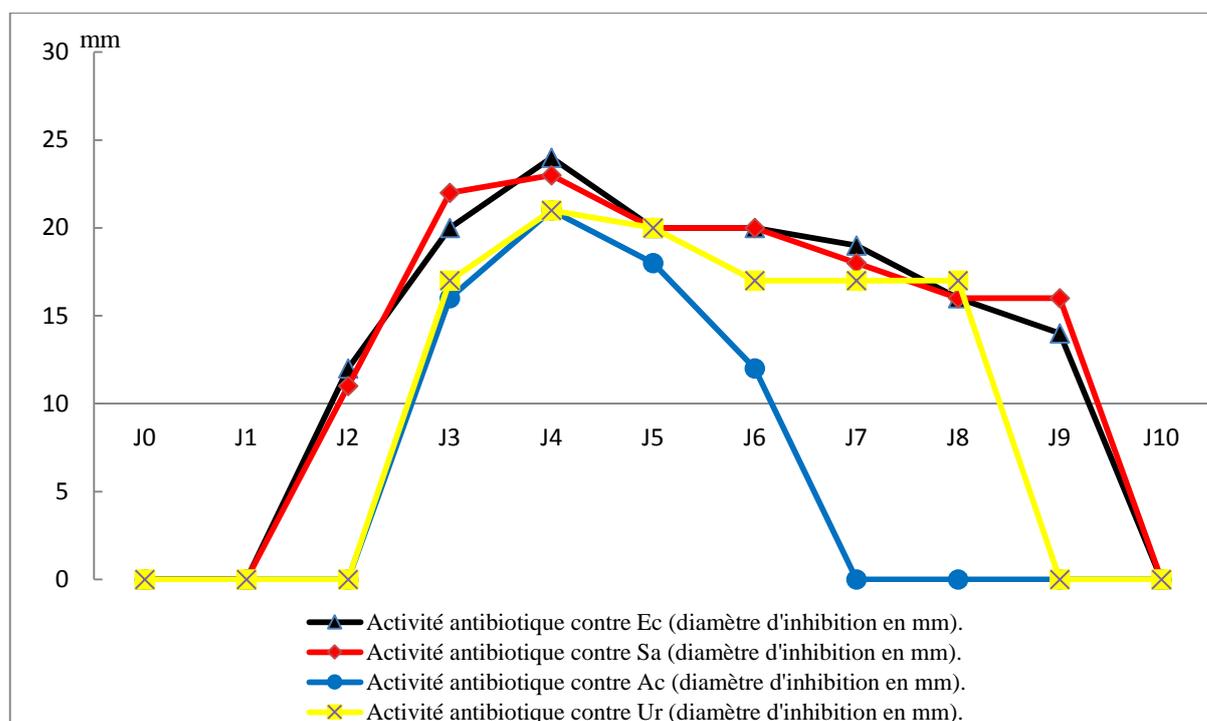
Les microorganismes cibles sélectionnés à cet effet sont *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 et *Aspergillus carbonarius* vis-à-vis desquels une bonne activité antimicrobienne a été notée par stries croisées. Le tableau 13 ci-dessous montre les activités enregistrées durant les 10 jours.

Tableau 13. Résultats des activités antimicrobiennes de la souche PA07 suivie durant 10 jours vis-à-vis de quatre microorganismes-cibles. Les diamètres d'inhibition sont exprimés en millimètre.

|                | <b>Ec</b> | <b>Sa</b> | <b>Ac</b> | <b>Ur</b> |
|----------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| <b>Jour 1</b>  | -         | -         | -         | -         |
| <b>Jour 2</b>  | 12        | 11        | -         | -         |
| <b>Jour 3</b>  | 20        | 22        | 16        | 17        |
| <b>Jour 4</b>  | 24        | 23        | 21        | 21        |
| <b>Jour 5</b>  | 20        | 20        | 18        | 20        |
| <b>Jour 6</b>  | 20        | 20        | 12        | 17        |
| <b>Jour 7</b>  | 19        | 18        | -         | 17        |
| <b>Jour 8</b>  | 16        | 16        | -         | 17        |
| <b>Jour 9</b>  | 14        | 16        | -         | -         |
| <b>Jour 10</b> | -         | -         | -         | -         |

Ec: *Escherichia coli*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ac: *Aspergillus carbonarius* ; Ur: *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829 ; - : diamètre d'inhibition nul.

La figure 15 illustre par un graphe les résultats de la cinétique de production des activités antimicrobiennes de la souche PA07.



**Figure 15.** Cinétiques de production des activités antimicrobiennes de la souche PA07 sur milieu ISP2 solide.

Les activités antibactériennes sont mesurées par la méthode des cylindres d'agar. Le diamètre d'inhibition comprend celui du cylindre d'agar qui est de 10 mm.

Ec: *Escherichia coli*; Sa: *Staphylococcus aureus*; Ac: *Aspergillus carbonarius* ; Ur: *Umbelopsis ramanniana* NRRL1829

L'activité est très forte contre les quatre microorganismes-cibles, mais plus forte contre les deux bactéries-cibles par rapport aux champignons filamenteux. Elle débute au 2<sup>ème</sup> jour, continue à augmenter puis atteint une valeur maximale au 4<sup>ème</sup> jour. L'activité diminue par la suite puis se stabilise légèrement et disparaît complètement entre le 9<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour (selon le microorganisme-cible).

### 3. Discussion

Le potentiel antagoniste des trois souches d'actinobactéries (PA03, PA07 et PA14) a été évalué par la méthode des stries croisées contre plusieurs microorganismes-cibles pathogènes et/ou toxigènes pour l'homme et dont certains sont multi-résistants aux antibiotiques.

Les milieux ISP2 et Bennett ont été choisis pour cette évaluation. Ce choix a été fait en tenant compte des nombreux résultats obtenus dans ce domaine au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'ENS de Kouba (Alger). Ces deux milieux sont connus pour être parmi les plus favorables à la production d'antibiotiques (Zitouni, 2005; Lamari, 2006; Boudjella, 2007; Toumatia, 2010; Driche, 2010; Aouiche 2010 ; Toumatia, 2015; Lahoum, 2017; Bouznada, 2018).

Les résultats ont montré que presque la totalité des souches possèdent une activité antimicrobienne. Ces résultats sont intéressants et mettent en évidence le potentiel antimicrobien des isolats des sols sahariens. Cependant, ils ont montré que l'activité inhibitrice varie selon les isolats et les germes-cibles. La souche PA07 possède un spectre d'action large (antibactérien et antifongique) avec des activités importantes mais essentiellement antibactériennes. La souche PA14 possède une activité intéressante mais exclusivement antibactérienne et la souche PA03 possède une activité antifongique faible et antibactérienne moyenne à spectre très étroit dirigé uniquement contre *Pseudomonas aeruginosa*.

Il faut savoir que la méthode de l'évaluation du potentiel antagoniste par stries croisées est très subjective. La souche PA03 par exemple pourrait montrer des activités beaucoup plus importantes dans d'autres conditions culturales (sur d'autres milieux de composition différente ou peut être sur les mêmes milieux mais de consistance différente c.à.d. liquide). En effet, plusieurs travaux ont déjà montré cela et la méthode des stries croisées reste juste un moyen, de screening et de sélection, subjectif.

Le milieu ISP2 s'est révélé être le meilleur milieu de production par rapport au milieu Bennett. Les deux milieux sont complexes et riches et ont déjà donné tous les deux de bons résultats, cependant le milieu ISP2 s'avère souvent être parmi les meilleurs milieux de production des antibiotiques (Toumatia, 2010; Driche, 2010; Aouiche 2010; Lahoum, 2017).

Les cinétiques de production des activités antimicrobiennes ont révélé que l'activité débute au 2<sup>ème</sup> jour et atteint son maximum au 4<sup>ème</sup> jour. Plusieurs travaux réalisés sur des *Streptomyces* ont déjà montré qu'entre le 2<sup>ème</sup> et le 4<sup>ème</sup> jour, cela correspond souvent au milieu voir la fin de la phase exponentielle (Aouiche et *al.*, 2012a, b). En effet, la production d'antibiotiques débute souvent au milieu de la phase exponentielle - début de la phase stationnaire ou parfois en phase de déclin. Les maxima de production sont souvent notés au début de la phase de déclin. Ceci correspond bien au cas des métabolites secondaires. De manière générale, la production des métabolites secondaires par les microorganismes a lieu durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries, cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire et de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

Les microorganismes multi-résistants sont comme leur nom l'indique souvent résistants à la plupart des antibiotiques, cependant, il ne semble pas y avoir une corrélation assez nette entre la multirésistance des microorganismes utilisés (voir profils de résistance, chapitre: matériel et méthodes) et leur résistance aux antibiotiques sécrétés par nos isolats d'actinobactéries. Cela suppose que les isolats sécrètent des antibiotiques autres que ceux auxquels les bactéries résistent.

Il faut souligner que les deux meilleurs isolats (PA07 et PA14) ont été rattachés au genre *Streptomyces*. En effet, plusieurs isolats de *Streptomyces* sont connus pour leur production d'antibiotiques actifs contre des microorganismes pathogènes pour l'Homme et multi-résistants aux antibiotiques (Boudemagh *et al.*, 2005 ; Kitouni *et al.*, 2005 ; Kumar et kannabrian, 2010).

## **Conclusion et perspectives**

Les dernières décennies ont été marquées par une augmentation inquiétante du nombre de microbes pathogènes et multirésistants aux antibiotiques et par l'émergence de nouveaux agents pathogènes.

Actuellement, plusieurs stratégies de par le monde sont entreprises, dont celles qui reposent sur la recherche systématique de nouveaux antibiotiques naturels à partir de microorganismes.

L'exploration des ressources naturelles peu ou pas étudiées ou celles soumises à des conditions environnementales extrêmes sont un choix souvent privilégié pour isoler ces microorganismes. Parmi ces derniers, les actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces* ou à des genres peu fréquents à rares, sont particulièrement utiles dans l'industrie pharmaceutique par leur très grande capacité à produire des antibiotiques avec des structures chimiques et des modes d'action très diversifiés.

Le présent travail a permis de mettre en évidence l'activité antagoniste de trois souches d'actinobactéries d'origine saharienne contre neuf microorganismes-cibles (dont quatre bactéries multi-résistantes aux antibiotiques, et cinq champignons filamenteux). Les tests ont été effectués par la méthode des stries croisées sur deux milieux de culture, assez riches en éléments nutritifs : Bennett et ISP2.

Les résultats ont révélé des résultats très intéressants et les deux meilleures souches ont été identifiées comme étant des *Streptomyces*. La cinétique de production d'antibiotiques a été menée pour la meilleure souche sur milieu complexe ISP2 solide.

Du point de vue taxonomique, actuellement, la détermination de nouvelles espèces de microorganismes est basée essentiellement sur les critères moléculaires (Harvey *et al.*, 2001). Le genre *Streptomyces* comprend actuellement plus de 500 espèces valides. Les tests phénotypiques peuvent aussi être très utiles pour distinguer parfois entre des espèces très proches et sont indispensables pour la description d'une nouvelle espèce (Euzéby, 2002).

Les trois isolats ont fait l'objet d'une étude taxonomique sur la base de la morphologie et l'analyse phylogénique de l'ADN ribosomique 16S. Les résultats ont permis de rattacher les trois isolats aux genres *Streptomyces* (PA07, PA14) et *Lentzea* (PA03).

Les résultats obtenus sont intéressants et ouvrent des perspectives multiples qui concernent les points suivants :

- Entreprendre le screening en milieu liquide (en condition d'agitation) et sur plusieurs autres milieux de composition différente.

- Tester les souches contre un plus large éventail de germes-cibles pathogènes pour l'Homme, les animaux et les plantes.
- Améliorer la production de nos souches en recherchant les meilleures conditions (sources de carbone, d'azote, éléments minéraux, pH, température, aération,...).
- Produire les antibiotiques et déterminer leur structure.
- Réaliser une hybridation ADN-ADN pour confirmer l'appartenance des isolats aux espèces correspondantes ou pour montrer leur originalité.

## *Références Bibliographiques*

### A

- Ait Barka E., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klent HP., Clément C., Ouhdouche Y., et Wezel GP van (2016)** Taxonomy, physiology and natural products of *Actinobacteria*. *Microbial Mol Biol rev.*, 80 : 1 – 43.
- Aggoune-Khinache N., Bensersa D., Henniche F.Z., Daoudi M., Abdouni MA., Chabani A., Tiouit D. and Naim M. (2008)**- Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med. Mal. Infect.*, 39, 413-414.
- Alekshun Michael N. and Levy S.B. (2007)**. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *J. Cell.* **128** (6), 1037-1050.
- Aouiche A. (2010)** Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Mémoire de Magister en Microbiologie, Université Djillali Liabès de Sidi-Bel-abbès. 127 p.
- Aouiche A., Sabaou N., Zitouni A., Meklat A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A. (2012a)** *Saccharothrix* sp. PAL54, a new producing chloramphenicol strain isolated from a Saharan soil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 28:943-951.
- Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F. et Lebrihi A. (2012b)** Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *J. Mycol. Méd.* 22:42-51.
- Aouiche A, Sabaou N, Meklat A, Zitouni A, Bijani C, Mathieu F, Lebrihi A (2012)** *Saccharothrix* sp.PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J Microbiol Biotechnol* 28:943–951.
- Aouiche A., Bouras N., Mokrane S., Zitouni A., Schumann P., Spröer C., Sabaou N., Klenk HP (2015)** *Actinokineospora mzabensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 107(1):291-296.
- Asselineau J, Zalta JP (1973)** Les antibiotiques: structure et exemples de mode d'action. Hermine, Paris. 364 p.

## 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 en Microbiologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou. 226 p.
- Badji B, Mostafaoui A, Sabaou N, Lebrihi A, Mathieu F, Seguin E, Tillequin F (2007)** Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J Ind Microbiol* 34:403–412.
- Barrett D (2002)** From natural products to clinically useful antifungals. *Biochim Biophys Acta* 1587:224–233.
- Becker B., Lechevalier M.P., Gordon R.E. and Lechevalier H.A. (1964).**- Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12, 421-423.
- Becker B., Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1965).**- Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13, 236-242.
- Bhathena Z. P., Vora C., Kadam K. (2002).**- Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycetale consortium. *Pollution Research*, 21(3), 265-275.
- Berdy J, Aaszalos A, Mc Nitt KL (1987)** CRC Handbook of antibiotic compounds. Microbial metabolites. vol 13. Parties 1, 2, 3. *CRC Press*, Boca Raton, Florida, USA. 1072 p
- Berdy J. (2005).**- Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics* 58, 1–26.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012)** Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). vol 5: The Actinobacteria. 2<sup>ème</sup> édition, Springer, New York. 1750 p.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N., (2006)** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a saharan soil. *Microbiol res.*, 161 : 288-298.
- 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.
- Bouznada, K. (2018).** *Saccharothrix* et genres apparentés des sols de la région du M'ZAB : Isolement, Taxonomie, mise en évidence de nouvelles espèces et production d'antibiotiques contre divers microorganismes pathogènes. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Ecole Normale Supérieure de kouba. 201 p.

**Breton A, Theilleux J, Sanglier JJ, Vobi G (1989)** Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. *In: Larpent JP, Sanglier JJ (Eds). Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris. pp.*

**Butaye P, Cloeckaert A. and Schwarz S. (2003).**- Mobile genes coding for efflux mediated antimicrobial resistance in Gram-positive and Gram negative bacteria. *Intr. J. Antimicrob Agents.*, **22**, 205–10.

## C

**Carle S (2003)** Les antifongiques dans le traitement des infections invasives. *Pharmactuel* 36:25–41.

**Cattoir V. (2004).**-Pompes d'efflux et résistance aux antibiotiques chez les bactéries. *Pathologie Biologie.*, **52**, 607–616.

**Cavallo JD, Fabre R, Jehl F, Rapp C, Garrabé E (2004)** Bétalactamines. *EMC-Maladies infectieuses*. 1:129–202.

**Coates A.; Hu Y., (2007).** Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *British Journal of Pharmacology*, **152**, 1147–1154.

## D

**Demain A.L. (1999).**- Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Minireview. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **52**, 455-463.

**Demain A.L. (2006)** From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:486–495.

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

**Doumbou C. L.; Akimov V.; Beaulieu C., (1998).** Selection and characterization of microorganisms utilizing Thaxtomin A, a phytotoxin produced by *Streptomyces scabies*. *Applied Environment Microbiological.*, (64): 4313-4316.

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

**Durand-Parenti C. (2010).**- NDM-1, cette bactérie multirésistante que redoutent les scientifiques. Source internet: [www.viamed.fr/node/1247](http://www.viamed.fr/node/1247).

## E - F

- Essien J. P. and Udosen E. D. (2000).** - Distribution of actinomycetes in oil contaminated ultisols of the Niger Delta (Nigeria). *J. Environ. Sci.*, 12 (3), 296-302.
- Euzeby J.P. (2002).** - List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>
- Flatt PM, Wu X, Perry S, Mahmud T (2013)** Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. *J Nat Prod* 76:939–946.
- Feling R.H., Buchaman G.O. Mincer T.J. Kauffman C.A., Jensen P.R. et Fenical W. (2003)** Salinosporamide A: A highly cytotoxic proteasome inhibitor from a novel microbial source, a marine bacterium of the new genus *Salinosporai*. *Angew Int Ed.*, 42 : 355-357.
- Felsenstein J. (1985).** – Confidence limits on phylogenies : an approach using the bootstrap. *Evol*, 39, 783-791.

## G

- Genilloud O, Gonzalez I, Alazar O, Martin J, Vicente F (2010)** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J Ind Microbiol Biotechnol*. DOI 10.1007/s10295-010-0882-7
- Goodfellow M (2012)** Actinobacteria phyl. nov. *In*: Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. p. 33.
- Goodfellow M, Williams ST (1983)** Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol* 37:189–216.

## H – I - J

- Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T. (1994).**- *In*: *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.
- Ishizawa S.; Araragi M., (1976).** Composition of actinomycetes population in soil. *In*: *Actinomycetes, the boundary microorganisms*. Arai T. (Eds.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107
- Jiang Y, Chen X, Lou K, Mao P (2013)** Cultivable soil actinomycete communities in some areas of western China. *Acad J Biotechnol* 1(1):1–13.
- Jose PA, Santhi VS, Jebakumar SRD (2011)** Phylogenetic-affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic *Streptomyces* sp. inhabiting an Indian saltpan. *J Basic Microbiol* 51:348–356.
- Jose PA, Jebakumar SRD (2013)** Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbi*, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00240.

**Jukes T.H. and Cantor C.R. (1969).**- Evolution of protein molecules. *In* : Mammalian protein metabolism. Munro H.N. (Ed.). Vol. 3. Academic Press, New York, pp.21-132.

## **K**

**Khebizi. N. (2010).**- Taxonomie et activités antimicrobiennes de souches d'actinomycètes d'origine saharienne. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. 127 p.

**Kim BY, Brown R, Labeda DP, Goodfellow M (2011)** Reclassification of *Dactylosporangium variesporum* as *Saccharothrix variisporea* corrig. (ex Tomita et al. 1977) sp. nov., nom. rev. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:310–314.

**Krassilnikov, N.A., (1941)** Classification of Ray-fungi Actinomycetales. Academy of sciences of the USSR, Moscow.

**Kitouni M.; Boudemagh A.; Oulmi L.; Reghioua S.; Boughachiche F.; Zerizer H.; Hamdiken H.; Couble A.; Mouniee D.; Boulahrouf A.; Boiron P., 2005.** Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north–east of Algeria. *Journal de Mycologie. Médicale*, 15, 45–51.

## **L**

**Labeda DP, Kroppenstedt RM (2000)** Phylogenetic analysis of *Saccharothrix* and relate taxa: proposal for *Actinomycetaceae* fam. nov. *Int J Syst Evol Microbiol* 50:331–336.

**Lahoum, A., (2017)** Souches d'actinobactéries mycéliennes des sols sahariens : mise en évidence de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques et réduction de la concentration en aflatoxine B1. Thèse de doctorat. Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 269 p.

**Lamari L, Zitouni A, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Lebrihi A, Lefebvre G, Seguin E, Tillequin F (2002)** New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot* 55(8):696–701.

**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.

**Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2000).**– Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie. Van . Leeuwenhoek*, **78**, 399-405.

**Lechevalier HA, Lechevalier MP (1970b)** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In*: Prauser H (Ed). The Actinomycetales. G Fisher Verlag, Jena. pp: 393–405.

**Lechevalier M. P.; Lechevalier H. A., (1970).** Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In* : The actinomycetales. Prauser H. (eds) Jemu F. V. 311-316.

**Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970a).**- Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *In: The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds.) G. Fisher Verlag, Jena, 311-316.

**Lechevalier MP (1981)** Ecological associations involving actinomycetes. *In: Shaal et Pulverer* (Eds). *Actinomycetes. Zbl Bakt suppl* 11:159–166.

**Lechevalier M.P., De Bievre C. and Lechevalier H.A. (1977).**- Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.

## M

**McNeil M. M.; Brown M., (1994).** The Medically Important Aerobic Actinomycetes: Epidemiology and Microbiology. *Clin. Microbiol. Rev.*, 7 (3), 357-417.

**Mellouk, MEklat, Bouras, Mokrane, Mathieu, Nalubega, Chaabane-chaouch, Ait yahia, Sabaou (2016)** Description et potentiel antagoniste d'une nouvelle souche d'actinobactérie isolée de la cote de Tipaza. *Elwahat*. 1 : 65-78.

**Messai Y, Iabadene H, Benhassine T, Alouache S, Tazir M, Gautier V, Arlet G, Bakour R (2008)** Prevalence and characterization of extended-spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). *Pathol Biol* 56:319–325.

**Mizuno N.and Yoshida H. (1993).** -Effect of exchangeable aluminium on the reduction of potato. *Plant and soil*, 155 (1), 505-508.

**Mokrane, Bouras, Sabaou, Mathieu (2013)** Actinomycetes from saline and non-saline soils of saharan palm groves : taxonomy ecology and antagonist properties. *Afr. J. Microbiol Res.* 7 :2167-78.

## N

**Nakae K, Kurata I, Kojima F, Igarashi M, Hatano M, Sawa R, et al. (2013)** Sacchathridine, A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J Nat Prod* 76:720–722.

**Nonomura H. (1974).**- Key for classification and identification of 458 species of the *Streptomyces* included in I.S.P. *J. ferment. Technol.*, 52, 78- 92.

**Nordmann P, Poirel L, Toleman MA, Walsh T (2011)** Does broadspectrum  $\beta$ -lactam resistance due to NDM-1 herald the end of the antibiotic era for treatment of infections caused by Gram-negative bacteria? *J Antimicrob Chemother* 66:689–692.

## O

- Omura S., (1992).** The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.
- Okesola AO, Makanjuola O (2009)** Resistance to Third-Generation Cephalosporins and Other Antibiotics by Enterobacteriaceae in Western Nigeria. *Am J Infect Dis* 5(1):17–20.
- Okoro CK, Brown R, Jones AL, Andrews BA, Asenjo JA, Goodfellow M, Bull AT (2009)** Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek* 95:121–133.

## P

- Paterson DL (2006)** Resistance in gram-negative bacteria: Enterobacteriaceae. *Am J Infect Control* 34:S20–8.
- Pizzul L., (2006).** Degradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Actinomycetes. Thèse de Doctorat. Université d'Uppsala (Suède). pp 39.
- Poole K. (2004).**- Multidrug resistance in Gram-negative bacteria. *Curr. Opin. Microbiology.*, **4** (5) 500-508.
- Prescott, Harley, Klein, Woolverton (2013)** Microbiologie. Ed, Boeck, 4eme édition. 1184 p

## Q

- Quincampoix J.C. and Mainardi J.L. (2001).** - Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.*, **10**, 267-75.

## S

- Sabaou N, Amir H, Bounaga N (1980)** Le palmier dattier et la fusariose. X. Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère: leur antagonisme vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Ann Phytopathol* 12:253–257.
- Sabaou N. (1988).**- Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192p.
- Sabaou N, Hacène H, Bennadji A, Bennadji H, Bounaga N (1992)** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can J Microbiol* 38:1066–1073.

- Sabaou N, Boudjella H, Bennadji A, Mostefaoui A, Zitouni A, Lamari L, Bennadji H (1998)** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse* 9(2):147–153.
- Saitou N and Nei M. (1987).**- The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Salomon C. E.; Magarvey N. A.; Sherman D. H., (2004).** Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity: an ever brighter future for marine natural product drug discovery. *National Production Rep.*, (21):105-121.
- Sanglier JJ (1990)** Mycotoxines, mycoses et mycoallergies. *In: Botton B (Ed). Moisissures utiles et nuisibles: Importance industrielle. 2ème édition, Mason, Paris. pp: 437–453*
- Sanglier J.J., Haag H., Huck TA. and Fehr T. (1993).**- Novel bioactive compounds from Actinomycetes: a short review (1988-1992). *Res. Microbiol.*, **144** (8), 633-642.
- Shirling EB, Gottlieb D (1966)** Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 13:313–340
- Solanki R. and Kahanna M. (2008)** -Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.*, 48: 410–431
- Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A (2012)** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol* 7:373–390.
- Song J.; Weon H. Y.; Yoon S. H.; Parrk D. S.; Go S. G.; Suh J. W., (2001).** Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and Thermoactinimycetes isolated from mushroom composts in Korea based on 16S RNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 97-102.
- Stackebrandt E, Rainey FA, Ward-Rainey NL (1997)** A proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. *Int J syst Bacteriol* 47:479–491.

## T

- Takahashi Y. and Omura S. (2003).**- Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 49 (3), 141-154.
- Touati A, Benallaoua S, Forte D, Madoux J, Brasme L, Champs C (2006)** First report of CTX-M-15 and CTX-M-3  $\beta$ -lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int J Antimicrob Agents* 27:408–413.
- Touati A., (2006).**- Caractérisation des phénotypes de résistance acquis aux  $\beta$ -lactamines des souches d'entérobactéries isolées dans les hôpitaux de Béjaia. Doctorat soutenu à l'Université A. Mira de Béjaia.

**Toumatia O. (2010).**- Actinomycetes sahariens producteurs d,antifongiques: isolement, taxonomie, caracterisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger.115p.

**Toumatia, O., (2015)** Etude de quelques souches de Streptomyces des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum* : taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essaies de lutte contre fusariose du blé. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieur de Kouba Alger. 266p.

**Toumatiaa O., Compantc S., Yekkour A. Goudjal Y., Sabaoua N., Mathieu F, Sessitsch A., Zitouni A. (2016)** Biocontrol and plant growth promoting properties of Streptomyces mutabilis strain IA1 isolated from a Saharan soil on wheat seedlings and visualization of its niches of colonization. *South African Journal of Botany*. Vol 105 : 234-239.

## V

**Verma V. C.; Gond S. K.; Kumar A.; Mishra A.; Kharwar R. N.; Gange A. C., (2009).** Endophylitic Actinomycetes from *Azadirachta indica* A. Juss.: Isolation, Diversity, and Anti-Microbiol activity. *Microbiol Ecology.*, (57): 749-756.

**Ventura M., Canchaya C, (2007)** Genomics of *Actinobacteria*: Tracing the Evolutionary History of an Ancient Phylum. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 71: 495–548.

## W

**Wayne LG, Brenner DJ, Colwell RR, Grimont PAD, Kandler O, Krichevsky MI, Moore LH, Moore WEC, et al. (1987)** Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int J Syst Bacteriol* 37:463–464.

**Wellington EM, Ul-Hassan A (2009)** Actinobacteria. *In*: Moselio, Schaechter (Ed). Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, Oxford. pp. 26–44.

## Z

**Zamoum M, Goudjal Y, Sabaou N, Mathieu F, Zitouni A, (2017)** Developpement of formulations based on Streptomyces rochei strain PTL2 spores for biocontrol of Rhizoctonia solani damping-off of tomato seeding. *Biocontrol Sci Technol.*, 27 :723-738.

**Zaitlin B.; Watson S.B., (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. 40 (9), 1741-1753.

**Zaitlin B.; Watson S. b.; Ridal J.; Satchwill T.; Parkinson D., (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can*, 95 (2): 113-118.

- Zermane F., 2007.** Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés organiques de synthèse.p33-38.
- Zhao GZ, Li J, Huang HY, Zhu WY, Zhao LX, Tang SK, Xu LH, Li WJ (2011)** *Pseudonocardia artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Artemisia annua* L. *Int J Syst Evol Microbiol* 61:1061–1065.
- Zitouni A., Boudjella H., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004).**- Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103. I. Taxonomy, Fermentation, Isolation and Biological Activities. *J. Antibiotics*, 57, 367-372.
- Zitouni A. (2005).** - Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Nocardiopsis* et des *Saccharothrix* des sols sahariens et production de nouveaux antibiotiques par *Saccharothrix* sp. 103. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri, Tizi Ouzou, 230 p.

---

**Annexe : Composition des milieux de culture****1/ Milieu ISP2 (*International Streptomyces Project*)**

|                    |          |
|--------------------|----------|
| -Glucose           | 10g /l   |
| -Extrait de malt   | 4g/l     |
| -Extrait de levure | 4g/l     |
| -Agar              | 18g/l    |
| -Eau distillée     | 1000 mL  |
| -Agar              | 18,0 g/L |
| -PH                | 7.3      |

**2/ Milieu Bennet**

|                    |          |
|--------------------|----------|
| -Glucose           | 10g/l    |
| -Peptone           | 2g/l     |
| -Extrait de levure | 1g/l     |
| -Extrait de viande | 1g/l     |
| -Agar              | 18g/l    |
| -Eau distillée     | 1000 mL  |
| -Agar              | 18,0 g/L |
| -PH                | 7.3      |

**3/ Milieu PCA (*Plate Count Agar*)**

|                     |          |
|---------------------|----------|
| - Tryptone          | 6,0 g/l  |
| - Extrait de levure | 2,5 g/l  |
| - Glucose           | 1,0 g/l  |
| - Agar              | 15,0 g/l |
| - PH                | 7        |
| - Eau distillée     | 1000mL   |