

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE DJILALI BOUNAAMA – KHEMIS MILIANA



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

Mémoire du projet de fin d'études en vue de l'obtention du diplôme de MASTER

Filière : Sciences biologique

Spécialité : Microbiologie appliquée

THEME

Identification phylogénétique de quelques actinobactéries des sols sahariens et potentiel antagoniste contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline

Présenté par

M^{lle} AGOULMINE Iléna

Soutenu le **15 Juillet 2019** devant le jury composé de :

Présidente : M ^{me} GUETARNI H.	Maitre de Conférences – A	UDB Khemis-Miliana
Promoteur : M. AOUCHE A.	Maitre de Conférences – A	E.S.S.A.I.A.
Co-promoteur : M. AOUN O.	Maitre de Conférences – A	UDB Khemis-Miliana
Examinatrice : M ^{me} AROUS F.	Maitre Assistante – A	UDB Khemis-Miliana
Examineur : M. ACHEK R.	Maitre Assistant – A	UDB Khemis-Miliana

Promotion 2018 – 2019

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au niveau du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba (Alger) sous la Direction du Dr. AOUCHE Adel, Maitre de conférences-A à l'Ecole Supérieure des Sciences de l'Aliment et des Industries Agroalimentaires, EL Harrach.

En premier lieu, je tiens à remercier énormément mon promoteur pour sa disponibilité, son soutien, ses conseils, sa patience et sa gentillesse. Qu'il trouve ici toute ma reconnaissance. Je remercie également mon Co-promoteur, Dr. AOUN Omar, maitre de Conférences-A à l'université de Khemis Miliana, pour ses conseils précieux et ses encouragements.

Par ailleurs, je tiens à remercier :

- M^{me} GUETARNI Hassina, Maitre de Conférences-A à l'université de Khemis Miliana, pour avoir accepté de présider le jury de soutenance.
- M^{me} AROUS F., Maitre assistante-A, à l'université de Khemis Miliana, pour avoir accepté d'examiner le mémoire.
- M. ACHEK R., Maitre-assistant-A à l'université de Khemis Miliana, d'avoir également accepté d'examiner ce travail.

J'adresse mes remerciements à tous les membres du Laboratoire LBSM de l'ENS-Kouba pour leur accueil et gentillesse. Sans oublier de remercier tous mes enseignants de l'Université Djilali BOUNAAMA.

Dédicaces

Je dédie ce modeste mémoire en premier lieu à mes parents

Ma mère khoukha, la prune de mes yeux

Mon père benyoucef, le meilleur papa du monde

*Qui me sont très chers en témoignage de leurs soutiens pendant toute
mon existence, d'autant plus qu'aucun mot ne pourra exprimer mes
vifs gratitude et profonde affection*

*Honorable, affable vous représentez pour moi la bonté par excellence,
source d'amour et de tendresse*

Je pris Allah de les protéger et de leur réserver une longue vie.

Aussi, je dédie ce travail :

*A mes très chers frères Amed, Rahim, Idir et mes très chères sœurs
Rahima et Sarah*

*A mes belles sœurs Khadidja et Bouchra et mes beaux-frères Foufik
et Imed*

A toute la famille Agoulmine et Amour

A mon fiancé Khaled et sa famille

*A tous mes collègues et amies, surtout Yasmine, Hadjer, Sarah,
Nour elhouda, Salima, Kenza, Amina, Medjda et Asmaa*

*Ainsi que toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la
réalisation de ce labeur*

*« A mes très très chers parents avec vous je resterai et pour vous
je demeurerai »*

Sommaire

REMERCIEMENTS

RESUME

INTRODUCTION GENERALE 1

PARTIE I : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

I. - LES ACTINOBACTERIES.....	3
1.- Caractères et position taxonomique actuelle	3
2.- Taxonomie des actinobactéries.....	3
2.1.- Evolution des critères et tendance actuelle.....	3
2.2.- Approches d'identification des actinobactéries.....	4
2.1.1.- Critères morphologique.....	4
2.1.2.- Critères chimique.....	4
2.1.3.- Critères physiologiques.....	8
2.1.4.- Critères moléculaires.....	8
2.1.4.1.- Analyses des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S.....	8
2.1.4.2.- Hybridation ADN-ADN.....	10
3.- Habitat et répartition.....	10
4.- Intérêt des actinobactéries	11
II.- LES ANTIBIOTIQUES	11
1.- Classification des antibiotiques.....	11
1.1.- Classification chimique.....	11
1.2.- Autres types de classification	12
2.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques.....	12
3.- Mécanismes d'action des antibiotiques.....	13
4.- Mécanismes de résistance aux antibiotiques.....	13
III.- LES AFFECTIONS MICROBIENNES.....	14

1.- Les affections bactériennes	14
1.1. Le cas de <i>Listeria</i>	15
1.2. Le cas de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA.....	15
2.- Les affections fongiques	16

PARTIE II : MATERIEL ET METHODES

I.- ISOLATS BACTERIENNES ET REVIVIFICATION	17
1.- Origine des actinobactéries	17
2.- Bactéries-cibles	18
3.- Milieux de culture	18
4.- Revivification et purification des isolats	18
II.- ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES.....	19
1. Mise en évidence du potentiel antibiotique	19
1.1. Méthode des stries croisées.....	19
1.2. Méthode des disques d'agar	20
2. Durabilité et type d'action antibiotique	21
2.1. Durabilité de l'action antibiotique	21
2.2. Type d'action	21
III.- IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIES.....	21
1.- Etude morphologique.....	22
1.1.- Etude macromorphologique.....	22
1.2.- Etude micromorphologique.....	22
2.- Etude phylogénétique	22
2.1. Traitement des séquences Forward et Reverse.....	22
2.2. Détermination de l'espèce la plus proche par Blast.....	23
2.3. Construction de l'arbre phylogénétique.....	24

PARTIE III : RESULTATS ET DISCUSSION

1.- RESULTATS DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES ACTINOBACTERIES	25
1. Activité antibactérienne sur Gélose nutritive.....	26

2. Activité antibactérienne sur milieu ISP-2.....	27
3. Comparaison des résultats et analyse des données	29
4. Durabilité et type d'action antibiotique	30
5. Discussion	31
2.- RESULTATS DE L'ETUDE TAXONOMIQUE.....	34
1. Caractéristiques macro et micromorphologiques.....	34
2. Résultats de l'étude phylogénétique.....	35
3. Discussion	37
CONCLUSION ET PERSPECTIVES.....	38
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	39
ANNEXE	

Liste des figures

Figure n°1	Micromorphologie des principaux genres d'actinobactéries.	P. 05
Figure n°2	Différents chimiotypes rencontrés chez les actinobactéries.	P. 07
Figure n°3	Clef d'identification des principaux genres d'actinobactéries basée sur les critères morphologiques et chimiques.	P. 09
Figure n°4	Schéma illustrant la mise en évidence du pouvoir antagoniste des actinobactéries par la méthode des stries croisées.	P. 19
Figure n°5	Schéma illustrant le résultat de l'activité antibiotique mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar.	P. 20
Figure n°6	Schéma explicatif montrant les étapes du traitement des séquences F et R jusqu'à l'obtention de la séquence d'ADNr 16S complète.	P. 23
Figure n°7	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre l'isolat PAL84 et les souches-types du genre <i>Actinokineospora</i> .	P. 24
Figure n°8	Photo mettant en exergue l'activité l'isolat H58 sur Gélose nutritive vis-à-vis de <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA .	P. 28
Figure n°9	Photos mettant en évidence l'activité antagoniste des isolats B10 et TH28 sur milieu ISP-2.	P. 28
Figure n°10	Histogramme montrant les activités antagonistes mises en évidence sur milieux complexes gélose nutritive et ISP-2.	P. 29
Figure n°11	Histogramme montrant une comparaison des activités antagonistes, de l'isolat TH28, obtenues sur milieu ISP-2 par deux méthodes différentes.	P. 30
Figure n°12	Micromorphologie de l'isolat H58 poussant sur milieu ISP-2 observée sous microscope optique au grossissement G 10 X 40.	P. 35
Figure n°13	Macromorphologie des isolats H58 (à gauche) et H61 (à droite) poussant sur milieu ISP-2.	P. 35
Figure n°14	Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant la relation entre les isolats H58, H61 et les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Nocardiopsis</i> .	P. 37

Liste des tableaux

Tableau n°1	Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries.	P. 06
Tableau n°2	Activité antibactérienne des treize isolats actinobactériens, évaluée sur gélose nutritive vis-à-vis de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA par les méthodes stries croisées et disques d'agar.	P. 26
Tableau n°3	Activité antibactérienne des treize isolats actinobactériens, évaluée sur milieu complexe ISP-2 vis-à-vis de <i>Listeria monocytogenes</i> et <i>Staphylococcus aureus</i> MRSA par deux méthodes.	P. 27
Tableau n°4	Résultats du suivi des activités antagonistes des isolats TH28 et B10 durant dix jours.	P. 31
Tableau n°5	Résultats des activités antimicrobiennes des isolats halophiles et basophiles évaluées antérieurement par méthode des disques d'agar en comparaison avec les résultats obtenus lors de la présente étude.	P. 33
Tableau n°6	Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de la souche H58 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Nocardiopsis</i> .	P. 36
Tableau n°7	Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de la souche H61 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Nocardiopsis</i> .	P. 36

RESUME

Treize isolats d'actinobactéries extrêmophiles (halophiles, basophiles et thermophiles) ont été étudiés dans le but d'évaluer leurs propriétés antagonistes. Ils ont été testés contre *Staphylococcus aureus* MRSA et *Listeria monocytogenes* sur deux milieux de culture complexes différents (Gélose nutritive et ISP-2) par la méthode des disques d'agar. Les isolats thermophiles ont été testés par deux méthodes (stries croisées et disques d'agar). Les résultats ont permis de mettre en évidence l'activité antagoniste de six isolats. La meilleure activité a été notée pour l'isolat B10 contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (35 mm).

L'étude de la durabilité et du type d'action antibiotique a été menée sur deux isolats et a permis de mettre en exergue leur action bactéricide vis-à-vis des bactéries-cibles.

L'étude taxonomique, menée sur deux isolats et basée sur une étude morphologique et phylogénétique par l'analyse de leur séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S a permis de les rattacher au genre *Nocardiopsis*. Les deux isolats H58 et H61 ont été rapprochés des espèces *N. litoralis* (avec un taux de similarité de 99,9%) et *N. xinjiangensis* (avec un taux de similarité de 99,6%), respectivement.

Mots clés: actinobactérie, antagonisme, phylogénie, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*

ABSTRACT

Thirteen extremophilic actinobacterial isolates (halophilic, basophilic and thermophilic) have been studied in order to evaluate their antagonistic properties. They were tested against *Staphylococcus aureus* MRSA and *Listeria monocytogenes* on two different complex culture media (Nutrient Agar and ISP-2) by the agar disc method. Thermophilic isolates were tested by two methods (cross streaks and agar discs). The results highlighted the antagonistic activity of six isolates. The best activity was noted for B10 isolate against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (35 mm).

The study of the durability and the type of antibiotic action was carried out on two isolates and showed their bactericidal action against the target bacteria.

The taxonomic study, conducted on two isolates and based on a morphological and phylogenetic studies by the analysis of their DNA sequences coding for 16S rRNA, made it possible to relate them to the genus *Nocardiopsis*. Isolates H58 and H61 were belonged to *N. litoralis* (with a similarity rate of 99.9%) and *N. xinjiangensis* (with a similarity rate of 99.6%), respectively.

Key words: actinobacteria, antagonism, phylogeny, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*.

INTRODUCTION

Introduction

Le phénomène de la multirésistance bactérienne aux antibiotiques ne cesse de s'amplifier de façon inquiétante. En effet, les microorganismes ne cessent de s'adapter à l'environnement imposé par une mauvaise et massive utilisation de ces substances qui aurait pour fâcheuse conséquence de sélectionner les souches les plus résistantes.

Plusieurs travaux publiés dans le monde et en Algérie, ont déjà rapporté l'apparition de nouvelles souches bactériennes résistantes ou multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés, dont certains sont des molécules récentes (3ème et 4ème générations d'antibiotiques) (Touati, 2006; Aggoune-Khinache *et al.*, 2008; Messai *et al.*, 2008; Okesola et Makanjuola, 2009).

Devant une telle situation, la recherche de nouveaux antibiotiques est donc une nécessité qui doit être menée perpétuellement. Pour ce faire, de nombreuses stratégies existent, parmi lesquelles, le criblage de souches microbiennes productrices de nouvelles molécules antibiotiques.

Parmi les microorganismes producteurs d'antibiotiques, les actinobactéries sont connus par leur grand potentiel (Valan Arasu *et al.*, 2008; Jose et Jebakumar, 2013). Le genre *Streptomyces* est le plus important et est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques d'origine actinobactérienne (Jose *et al.*, 2011). Il est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de nombreux laboratoires dans le monde (Demain, 2006). Cela n'empêche que beaucoup d'autres genres dits rares (ex : *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, etc.) ont déjà montré un grand potentiel de production de molécules bioactives (Genilloud *et al.*, 2010 ; Flatt *et al.*, 2013; Nakae *et al.*, 2013).

En Algérie, les sols sahariens et semi-arides se sont révélés être très riches en actinobactéries, aussi bien sur le plan quantitatif que qualitatif (diversité) (Sabaou *et al.*, 1980, 1992 et 1998). En effet, une série de travaux publiés (Zitouni, 1995; Mostefaoui, 1996; Nekhili, 1996; Nouasri, 1996; Bouti, 1997 et Zebiri, 1997; Zitouni *et al.*, 2004; Boubetra *et al.*, 2013a,b et 2015; Aouiche *et al.*, 2015; Bouras *et al.*, 2015) portant sur l'isolement d'actinobactéries à partir des sols sahariens algériens, la taxonomie et l'étude des antibiotiques sécrétés, a été réalisée dans le Laboratoire de Microbiologie de l'ENS de Kouba-Alger, actuellement Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM). Bon nombre de ces travaux ont abouti à la découverte de nouvelles espèces productrices de nouveaux antibiotiques (Lamari *et al.*, 2002a,b; Zitouni *et al.*, 2004a,b et 2005; Badji *et al.*, 2005; 2006 et 2007; Merrouche *et al.*, 2010; Boubetra *et al.*, 2012 ; Boubetra *et al.*, 2013a,b et 2015; Aouiche *et al.*, 2015; Bouras *et al.*, 2015).

Dans le présent travail, nous nous sommes fixés comme objectifs d'évaluer le pouvoir antagoniste de quelques actinobactéries vis-à-vis de *listeria monocytogenes* et *staphylococcus aureus* résistants à la pénicilline, et d'autre part identifier ces bactéries par méthodes phylogénétiques basées sur le traitement des séquences d'ADN codant pour l'ARN 16S, par logiciels bio-informatiques et leur comparaison dans les banques génomiques.

Ce travail se divise en trois parties:

La première partie du manuscrit est consacrée pour la présentation bibliographique. Nous y avons expliqué principalement les méthodes utilisées pour 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, traite les résultats obtenus et leurs discussions

Chapitre I

Revue bibliographique

I. - LES ACTINOBACTERIES

1.- Caractères et position taxonomique actuelle

Les actinobactéries ont été longtemps rapprochées des champignons à cause de leur structure mycélienne particulière, jusqu'à la découverte de leur structure cellulaire procaryotique qui a permis de les inclure définitivement parmi les bactéries où ils constituent aujourd'hui l'ordre des *Actinomycetales* (Anzai *et al.*, 2008; Wellington et Ul-Hassan, 2009). D'ailleurs, l'ancien nom des actinobactéries est «actinomycètes». Ce dernier provient du Grec « aktino - mycètes » ou «champignons à rayons » ou encore « champignons rayonnants» (Gottlieb, 1973).

Les actinobactéries sont des bactéries saprophytes, bacille à Gram-positif (Dgigal, 2003), ayant un pourcentage en guanine-cytosine élevé, compris généralement entre 60 et 70 % (Larpent, 1989).

La plupart des espèces sont immobiles, aérobies, mésophiles, hétérotrophes mais certaines sont chimio-autotrophes (Ensign *et al.*, 1993). Ils se reproduisent par scission binaire ou par production de spores ou des conidies (Ludwing *et al.*, 2012).

La taxonomie des actinobactéries est basée sur un ensemble de caractères morphologiques, physiologiques, chimio-taxonomiques et génomiques qui sera détaillée plus bas. La taxonomie actuelle basée sur les données de la biologie moléculaire (notamment le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S) classent les actinobactéries dans le règne des *Procaryotae*, phylum des *Actinobacteria*, classe des *Actinobacteria* qui regroupe quinze ordres (Goodfellow *et al.*, in Bergey's Manual, 2012).

2. Taxonomie des actinobactéries

2.1.- Evolution des critères et tendance actuelle

Pour identifier une actinobactéries, les méthodes classiques, employées encore il y a quelques années nécessitaient la détermination des caractéristiques morphologiques (macro et micro-morphologie) et chimio-taxonomiques (analyse des constituants cellulaires) pour la reconnaissance du genre et la détermination des caractéristiques physiologiques et phylogénétiques (séquençage de l'ADN codant pour l'ARN 16S et hybridation ADN-ADN) pour l'identification de l'espèce.

La tendance actuelle consiste à identifier directement le genre et l'espèce par analyse phylogénétique et compléter les autres testes (physiologiques et chimiques) uniquement dans le cas de découverte de nouveaux taxons. Ceci permet de préserver les produits et évite de mener inutilement des manipulations très lourdes de chimio-taxonomie.

2.2.- Approches d'identification des actinobactéries

Les études morphologiques et chimio-taxonomiques permettent la reconnaissance du genre actinobactérien en se basant sur une clef d'identification; quant à l'espèce, elle est déterminée par étude phylogénétique. Une étude physiologique complémentaire peut s'avérer utile pour comparaison des caractères distinctifs entre espèces.

2.2.1.- Critères morphologiques

Les caractères morphologiques sont classés en caractères macro-morphologiques et micro-morphologiques.

➤ Caractères macromorphologiques (ou cultureux)

Ces caractères reposent sur une observation à l'œil nu des cultures actinobactériennes poussant sur des milieux de culture en notant :

- La présence ou l'absence du mycélium aérien (MA).
- La couleur du MA et du mycélium du substrat (MS).
- La présence ou l'absence des pigments diffusibles dans le milieu de culture.

➤ Caractères micro-morphologiques

La micromorphologie des actinobactéries est notée par observation directe au microscope optique des colonies poussant sur milieux gélosés. Elle consiste à déterminer si les mycéliums aérien et de substrat sont fragmentés ou pas. La formation des spores exogènes sur le MA et/ou le MS, leur forme ; leur taille et leur agencement (isolées ou en chaînes) sont notés. La présence ou non de sporanges, leur forme et taille, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.

La Figure 01 illustre la structure micromorphologique des principaux genres actinobactériens.

2.2.2.- Critères chimiques (chimiotaxonomie)

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. Sur la base de ces compositions plusieurs chimiotypes sont déterminés (Lechevalier et Lechevalier., 1970a,b; Lechevalier *et al.*, 1977). Ces derniers combinés à l'étude micromorphologique permettent la détermination du genre en se basant sur une clef d'identification détaillée plus loin (Holt *et al.*, 1994).

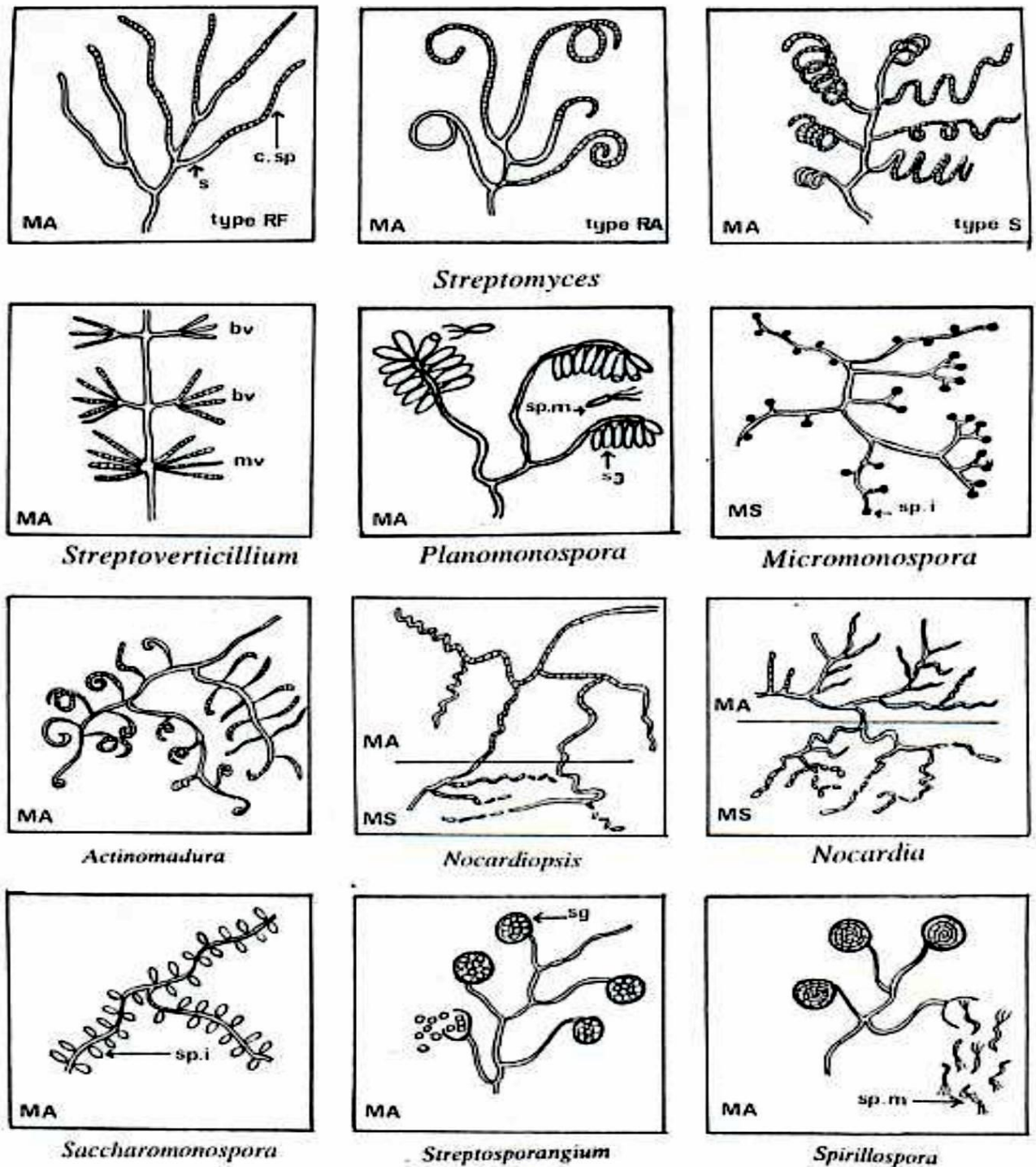


Figure 01 : Micromorphologie des principaux genres d'Actinobactéries (Sabaou, 1988).

M.A: 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: Sporangies.

➤ Composition pariétale en acides aminés

Dans la paroi actinobactérienne, l'acide diaminopimélique (DAP) existe en forme isomérique LL ou DL. Il peut y avoir la forme LL dans le cas par exemple de *Streptomyces* et *Nocardioïdes* et DL dans le cas de *Saccharothrix* et *Micromonospora*.

Dans d'autres cas, l'acide diaminopimélique est remplacé par la lysine ou l'ornithine et parfois par l'acide diaminobutyrique (Holt *et al.*, 1994).

➤ Composition en glucides cellulaires

A propos de la composition glucidique, il existe des sucres ou couples de sucres dits «caractéristiques», c'est-à-dire importants sur le plan taxonomique (ex: couples «arabinose-galactose», «xylose-arabinose», «rhamnose-galactose» qui caractérisent certains genres) et des sucres dits «non caractéristiques» c'est-à-dire pas importants taxonomiquement (ex: ribose, glucose, galactose, mannose) (Lechevalier et Lechevalier, 1970a).

➤ Détermination des chimiotypes

Selon la composition cellulaire en acides aminés et en glucides, plusieurs chimiotypes de parois cellulaires ont été établis par Lechevalier et Lechevalier (1970a,b).

La Figure 2 illustre les différents chimiotypes rencontrés chez les actinobactéries.

➤ Composition membranaire et pariétale en lipides

Dans certaines situations, le chimiotype basé sur la composition en acides aminés et en sucres n'est pas suffisante pour identifier le genre actinobactérien. Dans ce cas il est indispensable de déterminer la composition en lipides cellulaires (classés en types) pour distinguer les genres similaires. Le Tableau 1, ci-dessous, résume les types de phospholipides membranaires (Lechevalier *et al.*, 1977).

Tableau 1. Types de phospholipides membranaires rencontrés chez les actinobactéries.

Types de phospholipides	Phosphatidyl éthanolamine	Phosphatidyl choline	Phospholipides avec glucosamine	Phosphatidyl glycérol
PI	-	-	-	V
PII	+	-	-	-
PIII	-	+	-	V
PIV	+	-	+	-
PV	-	-	+	+

+, présent. -, absent. V, variable selon les souches et espèces. Tous les actinobactéries possèdent la phosphatidyl-inositol.

Imprimer la figure 2

2.2.3.- La clef d'identification des genres d'actinobactéries

Une clef d'identification, adaptée selon Holt *et al.* (1994), est présentée en Figure 03 illustrant les principaux genres. Cette clef a été établie sur la base des critères morphologique et chimique.

2.2.4.- Critères physiologiques

Cette étude consiste à réaliser des tests physiologiques distinctifs entre les espèces appartenant à un même genre. Parmi ces tests, nous pouvons citer par exemple la capacité de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques, protidiques ou autres composés organiques (caséine, gélatine, Tween 80). D'autres tests comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (température, pH, salinité) sont également réalisés.

2.2.5.- Critères moléculaires

Les techniques moléculaires sont considérées actuellement comme l'outil le plus précis en taxonomie. Parmi les méthodes moléculaires utilisées en taxonomie, l'analyse des séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S et l'hybridation ADN-ADN sont les plus courantes. Il faut noter que l'efficacité et la fiabilité de ces techniques ont permis de réviser toute la phylogénie des actinobactéries à plusieurs niveaux hiérarchiques (Rheims *et al.*, 1999; Bergey's Manual, 2012).

2.2.5.1.- Analyses des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S

Les séquences d'ADN codant pour les ARN ribosomiques (5S, 16S et 23S) constituent un outil de choix pour étudier les relations phylogénétiques grâce à leur présence chez toutes les bactéries et la présence de zones très conservées ainsi que des parties à séquences variables (Schleifer et Ludwig 1989; Stackebrandt et Goebel 1994).

Pour ce faire, une extraction du génome entier doit avoir lieu, le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est amplifié par PCR (Polymerase Chain Reaction) et séquencé à l'aide d'un séquenceur. Par la suite, les séquences obtenues font l'objet d'une étude comparative avec les séquences de référence disponibles dans les banques génomiques libres sur internet (NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) regroupant les séquences de toutes les souches-types validées.

Cette comparaison nécessite un traitement préalable des séquences nucléotidiques qui vise à reconstruire les séquences d'ADN16S à l'aide d'un programme informatique tel que MEGA 7 (Stackebrandt *et al.*, 1997; Labeda et Kroppenstedt, 2000).

Imprimer la figure 3

2.2.5.2.- Hybridation ADN-ADN

Cette méthode est la plus précise et indispensable pour la description de nouvelles espèces. Elle consiste à comparer les séquences de deux génomes entiers issus de deux bactéries différentes en estimant le taux de similarité des séquences. Il faut noter que la définition même de l'espèce bactérienne est basée sur cette méthode. En effet, aujourd'hui une genomospécies est définie par un taux d'hybridation ADN-ADN supérieur à 70% pour des souches d'une population bactérienne donnée (Wellington et Ul-Hassan, 2009).

En pratique, cette valeur est exprimée sous forme d'un pourcentage d'hybridation ADN-ADN et de la stabilité thermique de l'hybride (Wayne et al. 1987).

En raison de la complexité de cette méthode, celle-ci n'est appliquée qu'après analyse des séquences du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S qui permet de dresser une liste des microorganismes les plus proches, lesquels pourront être confrontés un à un (si nécessaire) au microorganisme étudié par hybridation ADN-ADN.

En effet, si le pourcentage d'homologie entre deux séquences d'ADN codant pour l'ARN 16S est supérieur ou égal à 98.2%, seule l'hybridation ADN-ADN pourra nous renseigner sur l'appartenance des deux souches à la même espèce ou non. En revanche, si deux souches possédant entre elles un pourcentage inférieur à 98.2%, elles sont classées dans deux espèces différentes, sans besoin de réaliser l'hybridation ADN-ADN (Meier-Kolthoff *et al.*, 2013).

3.- Habitat et répartition

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels et les biotopes particulièrement dans les sols. Leur grande diversité métabolique permet leur existence dans des biotopes très divers tels que les déserts chauds, les glaciers, les sites pollués par hydrocarbures ou par métaux lourds, les lacs extrêmement alcalins et milieux très salés (Santhanam *et al.*, 2012). Ils sont présents dans le sol, l'air, les eaux douces, les eaux de mer, les composts, les débris végétaux, dans les plantes (endophytes), les lichens et dans d'autres substrats (Promnuan *et al.*, 2011).

En Algérie, les sols sahariens se sont avérés être très riches en actinobactéries aussi bien d'un point de vue quantitatif que qualitatif (richesse et diversité). Leur proportion frôle les 90% dans les sols des palmeraies, avec une prédominance du genre *Streptomyces* et à un degré moindre, *Micromonospora* et *Nocardia*, mais aussi une très grande diversité d'espèces (Sabaou *et al.* 1992).

4.- Intérêt des actinobactéries

Les actinobactéries ont la capacité à produire une grande variété de molécules bioactives intéressantes dans divers domaines. En biotechnologie microbienne, les actinobactéries jouent un rôle primordial dans les domaines pharmaceutique, agronomique, agroalimentaire et environnemental.

En effet, dans le domaine médical et pharmaceutique, les actinobactéries sont parmi les plus grands producteurs de composés actifs tels que les antiviraux, les antiparasitaires, les immunostimulants, les immunosuppresseurs et les vitamines. Cependant, dans ce domaine ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques (Räty et al., 2002; Takahashi et Omura, 2003; Solanki et kahana, 2008). D'ailleurs, la recherche de nouvelles souches à métabolisme original constitue l'une des stratégies à la découverte de nouvelles molécules médicamenteuses d'origine naturelle (Williams, 2009).

Dans le domaine agronomique, les actinobactéries jouent un rôle majeur de fertilisation par la minéralisation des matières organiques complexes (arsenal enzymatique), la synthèse de phytohormones stimulant la croissance des plantes et la fixation d'azote atmosphérique par le genre *Frankia* vivant en symbiose dans les nodules racinaires de certains arbres (Zaitlin et Watson, 2006). Par ailleurs, les actinobactéries jouent aussi un rôle essentiel dans la lutte biologique (bio-contrôle) vis-à-vis des agents phyto-pathogènes tels que *Alternaria*, *Botrytis*, *Fusarium* et *Pythium* (Natalia et Manucharova et al., 2006; Toumatia et al., 2016 ; Zamoum et al., 2017).

Dans d'autres domaines, les actinobactéries ont la capacité de dégrader une large gamme d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aromatiques et aliphatiques (Skplovská et al., 2003). Ils interviennent aussi dans l'industrie alimentaire comme protecteurs de certains fromages ou encore comme producteurs de certaines enzymes (ex: glucose, isomérase) et dans la biconversion des sous-produits industriels (Vandamme, 1985; Dixit et al., 2000).

II.- LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des substances d'origine naturelle, synthétique ou semi-synthétique capables de tuer les micro-organismes sensibles ou d'inhiber leurs croissances (Prescott et al., 2002).

1.- Classification des antibiotiques

1.1.- Classification chimique

D'après leurs structures chimiques, les antibiotiques ont été classés par Berdy et al. (1987) et Berdy, (2005) en neuf grandes familles. Ce type de classification est basé uniquement sur la

structure chimique des antibiotiques et ne prend nullement en considération les autres intérêts thérapeutiques.

1.2. - Autres types de classification

Il existe d'autres types de classifications d'antibiotiques utilisées dans le domaine pharmaceutique et surtout le domaine médical. En effet, il est possible de les classer en fonction de leur mode d'action, de leur type d'action, de leur spectre d'action, de leur origine ou encore de leur charge électrique selon le domaine d'intérêt.

- Selon leur spectre d'action, les antibiotiques peuvent avoir un large spectre, moyen ou très étroit.
- Selon le type d'action, les antibiotiques sont classés en bactéricides ou fongicides et bactériostatiques ou fongistatiques.
- En fonction du mode d'action, les antibiotiques se fixent sur des cibles moléculaires précises.
- Les antibiotiques naturels sont élaborés par divers organismes vivants, Ils peuvent être d'origine fongique, bactérienne ou actinobactérienne ou encore végétale.
- Les antibiotiques peuvent être à caractère acide, basique ou neutre (Berdy et al., 1987).

2.- Microorganismes producteurs d'antibiotiques

Les actinobactéries sont considérées jusqu'à maintenant comme étant le groupe microbien le plus producteur de molécules antibiotiques avec plus de 45% des molécules d'origine microbienne à leur compte (Solecka et al., 2012). Environ 80% des antibiotiques d'origine actinobactérienne sont produits par le genre *Streptomyces* ; le plus grand producteur des composés bioactifs connus (Demain, 2006; Jose et al., 2011; Solecka et al., 2012). Par ailleurs, d'autres genres d'actinobactéries ont déjà montré un grand potentiel de production de molécules bioactives intéressantes tels que *Saccharothrix*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Actinomadura*, *Amycolatopsis* et *Streptosporangium*, etc (Flatt et al., 2013; Nakae et al., 2013).

Il existe d'autres types de bactéries non mycéliennes productrices telles que *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Micrococcus*, *Proteus* et *Chromobacterium* (Solecka et al, 2012).

Les champignons sont également une importante source d'antibiotiques. D'ailleurs, le nombre d'espèces fongiques productrices d'antibiotiques est en augmentation considérable en passant de 10% (Breton et al, Sanglier, 1990) aux environs de 38% (Solecka et al, 2012).

3.- Mécanismes d'action des antibiotiques

Les antibiotiques présentent des modes d'actions spécifiques, certains inhibent la synthèse de la paroi, d'autres la membrane plasmique, la synthèse des acides protéique ou encore celle des acides nucléiques.

Les antibiotiques agissant au niveau de la paroi (ex: β -lactamines) inhibent la synthèse pariétale bactérienne en empêchant l'intégration des acides aminés constituant la muréine (Asselineau et Zalta, 1973).

Les antibiotiques agissant sur la membrane plasmique (ex. polymyxine) altèrent la membrane en provoquant la formation de pores laissant échapper le contenu cellulaire (Prescott, 2002). Les antifongiques (ex: amphotéricine B, nystatine) qui agissent sur la membrane plasmique agissent souvent sur les stéroïdes membranaires conduisant à la formation de pores avec perte du contenu cytoplasmique puis la mort de la cellule fongique (Carle, 2003).

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

Les molécules antibiotiques qui ont une action sur la synthèse des acides nucléiques peuvent empêcher la réplication de l'ADN ou encore la transcription de l'ADN en ARNm. L'inhibition de la réplication d'ADN bloque la division bactérienne (Asselineau et Zalta, 1973).

4.- Mécanismes de résistance aux antibiotiques

Ce phénomène constitue aujourd'hui l'une des plus graves menaces pesant sur la santé mondiale. Les bactéries qui développent des résistances aux antibiotiques échappent à l'action antibiotique par différents mécanismes. Nous pouvons les regrouper en deux principaux types, les mécanismes enzymatiques et non enzymatiques.

4.1.-Mécanismes enzymatiques

Les espèces bactériennes de la famille des *Enterobacteriaceae* présentent une résistance naturelle aux aminopénicillines en produisant des enzymes inactivant ces antibiotiques (Cattoir, 2004). D'autres bactéries telles que *Serratia* produisent une enzyme (céphalosporinase) apte à inactiver la céphalosporine (Yala et al. 2001).

4.2. Mécanisme non enzymatique

Il s'agit de plusieurs mécanismes physiques (non enzymatiques) employés par la bactérie afin de contrer l'action de l'antibiotique ou bien en l'empêchant de pénétrer dans la cellule ou en modifiant la cible de l'antibiotique ou en rejetant l'antibiotique.

4.2.1. L'imperméabilité

Les bactéries à Gram négatif possèdent dans leurs membranes pariétales externes des protéines appelées porines. Ces dernières permettent le passage des molécules hydrophiles de petite taille comme les β -lactamines, les aminosides et les phénicolés. Des mutations entraînant des modifications au niveau des porines responsables de la résistance acquise à plusieurs familles d'antibiotiques sont connues (Cavallo *et al.*, 2004).

4.2.2. Système d'efflux

Ce système repose sur l'expulsion des antibiotiques hors de la cellule grâce à des transporteurs membranaires appelés pompes d'efflux. Il existe notamment chez les bactéries n'ayant pas un système de dégradation intracellulaire (Cavallo *et al.*, 2004).

4.2.3. Altération des cibles d'antibiotiques

Le microorganisme devient résistant à l'antibiotique dans le cas où la cible est modifiée de telle façon que l'antibiotique ne puisse pas s'y fixer (Fauchère et Avril, 2002). C'est le cas de *Staphylococcus aureus* en modifiant les protéines de liaison à la pénicilline (PLP) (Quincampoix et Mainardi, 2001).

III.- LES AFFECTIONS MICROBIENNES

1.- Les affections bactériennes

Les bactéries pathogènes et multirésistantes aux antibiotiques sont responsables d'infections sévères pouvant causer de graves impasses thérapeutiques (Ji-Guang *et al.*, 2009). Parmi les agents bactériens, nous citons deux ayant fait l'objet du présent travail:

1.1. *Listeria monocytogenes*

Il s'agit d'un petit bacille à Gram positif, mobile à 20-25 °C, asporulé, aéro-anaérobie facultatif, souvent catalase positive et β -hémolytique. Largement répandues dans l'environnement, leur transmission par voie alimentaire est de loin la transmission la plus importante.

Le pH optimum de croissance est de 7,1. Aucune multiplication n'est possible à pH inférieur à 4,0 et les cellules sont détruites à pH inférieur à 3,3. La température optimale de croissance est comprise entre 30 et 39 °C mais les divisions peuvent se poursuivre jusqu'à 4 °C et même jusqu'à -2 °C, ce qui en fait un germe résistant à basse température, capable de survivre lors de la congélation et de reprendre ses divisions lors de la décongélation.

Résistante à de nombreux facteurs tels que l'acidité, l'hyper-osmolarité et l'activité d'eau basse. La résistance à la chaleur peut atteindre 30 minutes à 55 °C. *L. monocytogenes* est halotolérante. En effet, les divisions cellulaires se poursuivent jusqu'à des concentrations en sel de 10 % et la survie (sans divisions) peut atteindre plusieurs mois dans du sel pur.

L. monocytogenes est auxotrophe pour certains facteurs de croissance comme la biotine (vitamine B8), la riboflavine (vitamine B2), la thiamine (vitamine B1) ou certains acides aminés (leucine, isoleucine, valine).

La source de contamination humaine est représentée par les aliments, notamment les produits à base de lait cru, certaines charcuteries, les végétaux incorrectement lavés et désinfectés ou encore certains produits de la mer.

Le germe est capable de se multiplier à l'intérieur des cellules. La contamination verticale (mère-enfant) est également possible car le germe peut traverser le placenta. Chez les personnes fragiles (femme enceinte, enfant, personne immunodéprimée..) le germe peut passer dans la circulation sanguine ayant de graves conséquences (Bind *et al*, 1994; Avril., 2000).

1.2. *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (MRSA)

Staphylococcus aureus est un coccus à gram positif, aéroanaérobie facultatif. Entre 20 à 30% des individus portent *S. aureus* dans les narines antérieures. Cette espèce peut être responsable de sévères infections de la peau et des tissus (furoncles, endocardite, abcès rénaux, etc.). Beaucoup de ces souches sécrètent également des toxines et sont responsables d'intoxications alimentaires et d'infections urinaires (Avril., 2000).

La contamination humaine peut survenir par ingestion de germes ou de toxine préformée (voie alimentaire ou hydrique) ou par dispersion d'aérosols (inhalation). La contamination interhumaine n'est pas possible. Les aliments le plus souvent incriminés sont l'eau, le lait cru et les plats en sauce et les crèmes et pâtisseries.

La résistance aux β -lactamines chez les staphylocoques repose sur deux grands types de mécanismes: un mécanisme de résistance extrinsèque par production d'enzymes inactivant l'antibiotique et un mécanisme de résistance intrinsèque par modification des protéines de liaison à

la pénicilline (PLP) ou par acquisition de nouvelles PLP. Cette PLP additionnelle a moins d'affinité pour les β -lactamines (Jonge et Tomasz, 1993).

Certaines infections à staphylocoque sont faciles à traiter et d'autres, non. Les staphylocoques qui sont résistantes à la méthicilline sont connus sous le nom de *Staphylococcus aureus* résistant à la méticilline (SARM). Si elles ne sont pas traitées, les infections au SARM peuvent entraîner de graves complications qui mettent la vie en danger telles qu'une infection du système sanguin, des os ou des poumons (Roberts, 1998; Avril, 2000).

2.- Les affections fongiques

Les champignons microscopiques (levures et moisissures) provoquent des pathologies fongiques chez l'homme. On peut considérer trois types d'affections:

2.1.- Les affections mycosiques dues au développement fongique

Ces affections peuvent être superficielles (ex.: candidoses oropharyngées, digestives et génitales, pityriasis versicolor et les dermatophytoses) ou profondes (ex.: candidoses disséminées, aspergilloses, histoplasmoses); 90% d'entre elles sont provoquées par des espèces appartenant aux genres *Candida*, *Cladosporium*, *Epidermophyton*, *Microsporium* et *Trichophyton* (Huet, 1999).

2.2.- Les affections causées par les particules fongiques

L'une des principales causes d'allergies est l'exposition aux particules fongiques (spores, fragments de mycélium) par inhalation ou par contact physique (exposition cutanée) ou encore, par ingestion (Gillian et Roderick *et al.*, 1998).

2.3.- Les affections causées par les métabolites fongiques

Certaines conditions environnementales permettent la sécrétion des mycotoxines volatiles, produits notamment par *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium* et *Trichothecium* entraînant des effets nocifs sur la santé des individus exposés (Hendry et Cole, 1993). La majorité de ces substances sont de puissants composés toxiques qui peuvent contaminer les aliments et être consommées ainsi par l'Homme et les animaux. Ils sont cancérogènes (ex: aflatoxines, ochratoxine A), mutagènes (ex: trichotécènes), immunosuppresseurs (ex: patuline) et neurotoxiques (ex: citréoviridine) (Etzetel, 2002).

Chapitre II

Matériel et méthodes

Le présent travail a été réalisé durant la période allant du début Mars jusqu'à fin Mai 2019 au niveau du laboratoire de recherche de microbiologie de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (ENS, Kouba - Alger) sous la direction du Dr. AOUCHE Adel, Maitre de conférences-A au niveau de l'ESSAIA - El Harrach.

Notre travail a porté sur l'étude du pouvoir antagoniste de treize isolats actinobactériens extrêmophiles (04 basophiles, 07 halophiles et 02 thermophiles). En effet, le présent travail est divisé en deux principaux volets :

- Une étude d'évaluation du pouvoir antagoniste des actinobactéries extrêmophiles vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* résistant à la pénicilline.
- Une étude taxonomique, de deux isolats, basée essentiellement sur une étude morphologique et phylogénétique par l'exploitation des séquences d'ADNr 16S disponibles au laboratoire. Ceci a pour objectif principal l'application des connaissances théoriques acquises durant le cursus universitaire.

I. ISOLATS BACTERIENS ET REVIVIFICATION

1. Origine des actinobactéries

Les actinobactéries étudiés lors du présent travail proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba (Alger). Elles sont d'origine saharienne (Meklat, 2012). Ces isolats sont les suivants :

- | | | |
|---------------|---|----------------------|
| - Isolat B07 | } | Isolats basophiles |
| - Isolat B08 | | |
| - Isolat B10 | | |
| - Isolat B13 | | |
| - Isolat H29 | } | Isolats halophiles |
| - Isolat H30 | | |
| - Isolat H41 | | |
| - Isolat H52 | | |
| - Isolat H58 | | |
| - Isolat H61 | | |
| - Isolat H62 | } | Isolats thermophiles |
| - Isolat TH10 | | |
| - Isolat TH28 | | |

Les symboles « B », « H » et « TH » signifient « basophile », « halophile » et « thermophile ».

2. Bactéries-cibles

Les bactéries-cibles signifient les microorganismes tests contre lesquels le pouvoir antagoniste des treize isolats actinobactériens a été testé. Deux bactéries-cibles ont été utilisées lors de l'évaluation des propriétés antagonistes et des tests d'activité des antibiotiques produits. Ces microorganismes proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba. Il s'agit de bactéries pathogènes à Gram positif :

- *Staphylococcus aureus* MRSA 639c (souche résistante à la méticilline).
- *Listeria monocytogenes* ATCC13932

3. Milieux de culture

Afin de mettre en évidence le pouvoir d'antagonisme des treize isolats d'actinobactéries, deux milieux de culture complexes ont été utilisés, à savoir la gélose nutritive et le milieu ISP-2 (*International Streptomyces Project*). La composition de ces milieux est donnée en annexe.

Ces deux milieux ont été préparés au laboratoire à partir de composés déshydratés. Lors de la préparation, les conditions culturales des trois catégories d'actinobactéries extrêmophiles ont été prises en considération. Ainsi, le PH des milieux destinés aux isolats basophiles a été ajusté entre 8.5 et 9.0, les milieux destinés aux halophiles ont été additionnés de NaCl à 10 % et pour les actinobactéries thermophiles, le milieu de culture n'a pas été modifié. Seule la température d'incubation a été ajustée à 40 C°.

4. Revivification et purification des isolats

Les isolats actinobactériens ont été d'abordensemencés dans un milieu liquide ISP-2 permettant une revivification optimale des cellules fragilisées par la conservation à longue durée. Après incubation, les actinobactéries ayant donné une croissance en milieu liquide sont réensemencées sur milieux solide (ISP-2) en boîtes de Pétri. Une purification, quand nécessaire, a été réalisée par la méthode des quadrants jusqu'à l'obtention de cultures pures. Les actinobactéries sont alors repiquées sur le même milieu coulé en tube incliné puis conservées à 04 C° pour une utilisation ultérieure.

II. ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES

1. Mise en évidence du potentiel antibiotique

Deux méthodes et deux milieux de cultures ont été utilisés afin de mettre en exergue l'activité antibiotique des actinobactéries.

1.1. Méthode des stries croisées

Cette méthode a été utilisée uniquement pour les isolats thermophiles. Elle est inapplicable pour les basophiles et halophiles. En effet, la technique requiert la croissance de l'actinobactérie et du microorganisme-cible sur la même boîte de Pétri. Ceci n'est pas possible en raison de la modification du milieu (adapté aux basophiles et halophiles pour permettre leur croissance) ne satisfaisant pas les conditions culturelles de *Staphylococcus* et *Listeria*.

Le principe de cette méthode consiste à ensemencer l'actinobactérie sur le milieu de culture en une seule strie comme cela est indiqué sur la figure 04. Les boîtes de Pétri sont mises en incubation à 40°C pendant 6 jours. Durant cette période, les actinobactéries se développent et synthétisent leurs molécules antibiotiques dans le milieu de culture.

A l'issue des six jours d'incubation, les bactéries-cibles, en l'occurrence *Staphylococcus aureus* MRSA 639c et *Listeria monocytogenes* ATCC13932, sont ensemencées en un trait perpendiculaire à celui de l'actinobactérie (voir figure 04) puis incubées à 35 °C durant 24 heures.

La lecture des résultats est réalisée en mesurant, en millimètre, les zones d'inhibition entre la bordure de l'actinobactérie et le microorganisme-cible.

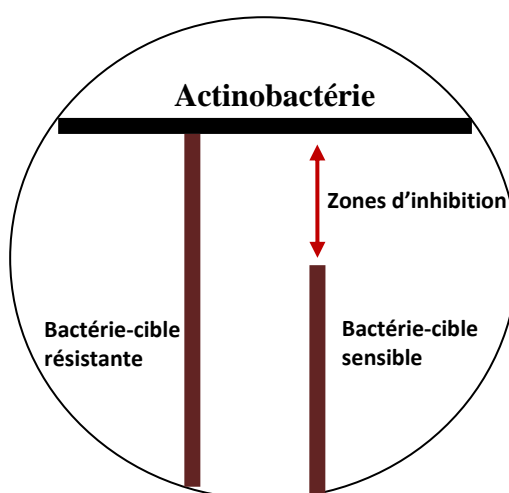


Figure 04. Schéma illustrant la mise en évidence du pouvoir antagoniste des actinobactéries par la méthode des stries croisées.

1.2. Méthode des disques d'agar

Cette méthode a été appliquée pour les isolats basophiles, halophiles et thermophiles. Elle consiste à ensemencer l'actinobactérie en surface du milieu de culture solide (Gélose nutritive et ISP2) et incubé les boîtes à 28 °C durant 06 jours. Tout en se développant, l'actinobactérie produit durant cette période ses antibiotiques qui diffusent dans le milieu de culture.

Au bout de 06 jours, d'autres boîtes de milieu PCA semi-solide (12 g/L d'agar) sont ensemencées en surface par la bactérie-cible (*Staphylococcus aureus* MRSA 639c et *Listeria monocytogenes* ATCC13932) à l'aide d'un écouvillon stérile. Ceci se fait à partir de suspensions, de chaque microorganisme-cible, préparées et ajustées à 0,5 Mcfarland à l'aide d'un densitomètre.

Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre sont alors prélevés à partir des cultures actinobactériennes à l'aide d'un emporte-pièce stérile. Ces disques d'agar sont déposés aseptiquement, devant bec bunsen, à la surface de la gélose PCA pré-ensemencée par la bactérie-cible. Ces boîtes sont mises à 4°C durant deux heures afin de permettre à l'antibiotique contenu dans le disque d'agar de diffuser dans la gélose PCA pendant que la bactérie-cible est inhibée temporairement par le froid. La gélose PCA est utilisée à l'état semi-solide, justement pour permettre une diffusion optimale des molécules antibiotiques.

Après deux heures au frigo, les boîtes sont mises à incubation à 35 °C pendant 24 heures afin de permettre aux bactéries-cible de se développer.

La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre des zones d'inhibition qui apparaissent autour des cylindres d'agar (figure 05).

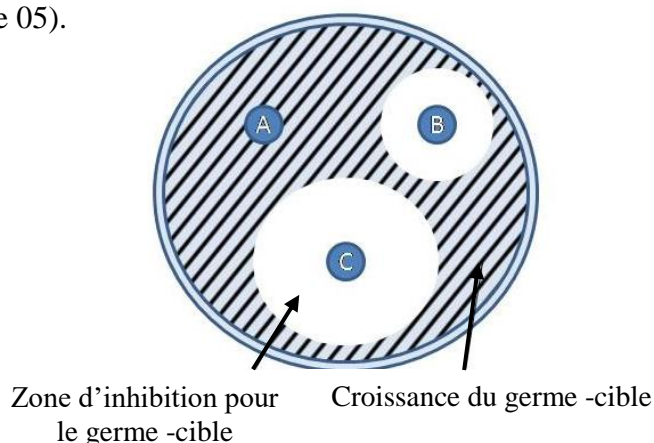


Figure 05. Schéma illustrant le résultat de l'activité antibiotique mise en évidence par la méthode des cylindres d'agar (Shomura *et al.*, 1979).

A, B et C représentent les cylindres d'agar prélevés aseptiquement de la culture actinobactérienne et déposés sur la gélose PCA semi-solide (12 g/L d'agar) ensemencée par la bactérie-cible à l'aide d'un écouvillon stérile.

Source du schéma : <https://wikimedia.org>

2. Durabilité et type d'action antibiotique

Afin de déterminer la durabilité de l'action antibiotique d'une part et le type d'action antibiotique (bactériostatique ou bactéricide) d'autre part, deux expériences ont été menées.

2.1. Durabilité de l'action antibiotique

La durabilité de l'action antibiotique signifie la persistance du diamètre de la zone d'inhibition en fonction du temps. Ceci se fait en mesurant la zone d'inhibition en millimètre chaque jour durant 10 jours. L'interprétation de la durabilité de l'action antibiotique dépend de plusieurs facteurs et peut donc conduire à plusieurs hypothèses qui seront détaillées en chapitre résultats et discussion. Les principaux facteurs impliqués dans l'interprétation de la durabilité de cette action sont :

- Type d'action antibiotique (bactéricide ou bactériostatique), déterminé par la présente étude.
- Mobilité de la bactérie-cible, connue à travers la littérature.
- Stabilité (fragilité) de la molécule antibiotique (détériorable rapidement ou très lentement).
A déduire en fonction des hypothèses émises.

2.2. Type d'action

Le type d'action est déterminé par une expérience qui consiste à faire un prélèvement en raclant la zone d'inhibition avec un écouvillon stérile puis ensemercer un tube à essai contenant un bouillon nutritif stérile. Une incubation des tubes est réalisée à 35 °C durant 24 heures (2^{ème} lecture de confirmation après 48 heures).

Un trouble dans le bouillon nutritif signifie un type d'action bactériostatique. L'absence de trouble signifie une action bactéricide.

III. IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIENS

L'identification de deux isolats a été réalisée par étude morphologique (macro et micromorphologie) et phylogénétique. Cette dernière a été menée en exploitant des séquences d'ADN codants pour l'ARN ribosomiques 16S fournies par le Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) dans le cadre de ses recherches.

1. Etude morphologique

1.1. Caractères macromorphologiques

Cette étude a été réalisée après 7 et 14 jours d'incubation à 30 °C sur milieu ISP-2, en appréciant le développement de l'actinobactérie tout en notant la couleur des mycéliums aériens et du substrat. La production des pigments diffusibles dans le milieu doit également être notée (Shirling et Gottlieb, 1966).

1.2. Caractères micromorphologiques

Cette étude est très importante pour une reconnaissance présomptive du genre. L'actinobactérie est observée directement sur la boîte de Pétri sous microscope optique aux grossissements 100 et 400. Ceci consiste à décrire la sporulation du mycélium aérien, la détermination des types de chaînes de spores et la fragmentation ou non du mycélium du substrat.

2. Etude phylogénétique

Les séquences de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S, disponibles au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (Ecole Normale Supérieure de Kouba) sont celles des isolats halophiles H58 et H61.

2.1. Traitement des séquences Forward et Reverse

La séquence de l'ADN codant pour l'ARN 16S est fournie en deux parties. L'une est appelée séquence F « Forward » et l'autre séquence R « Reverse ». Ces deux parties sont complémentaires avec une partie commune.

Tout d'abord, ces deux séquences doivent être traitées afin d'éliminer les erreurs d'une part et les assembler d'une manière correcte pour obtenir la séquence finale exploitable.

Les corrections et les traitements des séquences sont obtenus par logiciel bio-informatique appelé « **MEGA 7** ».

Lors de l'amplification de l'ADNr 16S par PCR la Taq polymérase est incapable de séquencer d'un trait tout le gène composé d'environ 1500 paires de base. Ceci entraînerait beaucoup d'erreurs et rendrait la séquence inexploitable. Afin de palier à ce problème, l'amplification de ce gène se fait dans deux directions différentes et en même temps. Il en résulte la formation de deux séquences complémentaires (F et R), comportant chacune des erreurs.

La première étape est d'inverser la séquence R (Figure 06) afin de mettre les deux séquences dans la même direction et pouvoir ainsi les aligner. L'inversement de la séquence « R » se fait par le logiciel MEGA en sélectionnant la séquence et en cliquant sur la fonction « reverse complement ».

La deuxième étape consiste à aligner les deux séquences F et R l'une sur l'autre et de déterminer leur partie commune au milieu (Figure 06). L'objectif de cette étape est d'éliminer les erreurs d'une part (en comparant les deux parties communes) et obtenir la séquence complète en coupant la partie complémentaire de la séquence R et en la collant à la séquence F, d'autre part.

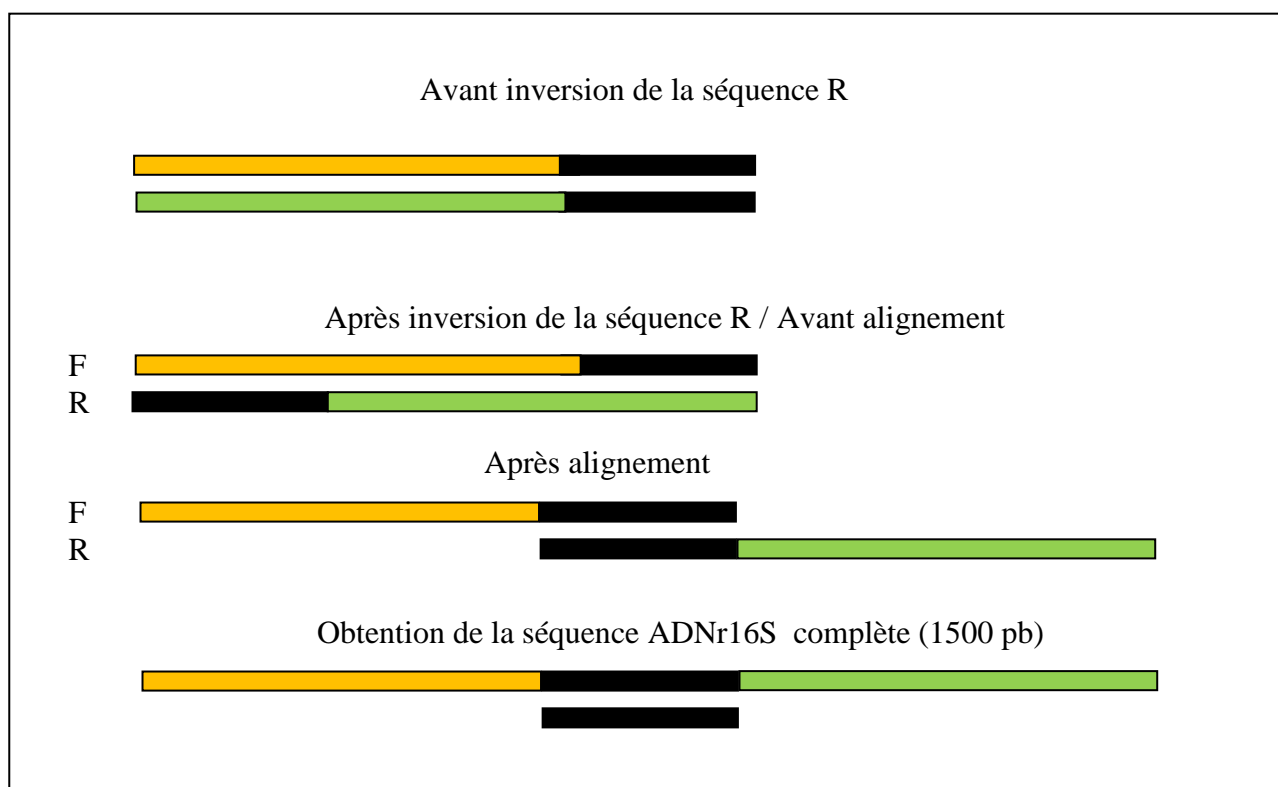


Figure 06 : Schéma explicatif montrant les étapes du traitement des séquences F et R jusqu'à l'obtention de la séquence d'ADNr 16S complète.

La partie noire des séquences représente la partie commune.

2.2. Détermination de l'espèce la plus proche par Blast

Une fois la séquence de l'ADN codant pour l'ARNr 16S est obtenue, elle est comparée par BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*) avec toutes les séquences ADNr 16S de tous microorganismes connus à ce jour. Cette comparaison a été faite sur le site web NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

Les résultats sont donnés dans un tableau où les espèces sont classées des plus proches aux moins proches tout en indiquant les taux de similarités en pourcentage.

Lorsque la séquence ADNr 16S de l'espèce la plus proche présente une similitude inférieure à 98,65 % avec la séquence de l'isolat étudié, ce dernier est considéré directement comme étant une nouvelle espèce (Kim *et al.*, 2014). Dans le cas où la similitude est supérieure à ce seuil (98,65 %), seule une hybridation ADN-ADN qui consiste à comparer l'intégralité des deux génomes peut affirmer ou infirmer l'appartenance de l'isolat étudié à cette espèce.

2.3. Construction de l'arbre phylogénétique

Les distances et les liens qui existent entre les différentes souches proches de l'isolat étudié sont illustrés par un arbre phylogénétique (Figure 07). Cela se fait en comparant la séquence de l'ADNr 16S de l'isolat étudié à celles des espèces les plus proches sélectionnées.

La première étape consiste à aligner les séquences ADNr16S de toutes les souches proches de l'isolat étudié, y compris ce dernier.

Des analyses logarithmiques sont ensuite effectuées par le biais du logiciel MEGA 7 en sélectionnant la méthode de Jukes et Cantor (1969) afin de calculer les matrices des distances d'évolution. Une analyse par méthode Neighbor-Joining (Saitou et Nei, 1987) est effectuée pour la construction des topologies des arbres phylogénétiques.

Les liens phylogénétiques établis entre les souches sont validés statistiquement par le test du Bootstrap (Felsenstein, 1985) qui consiste à répéter les tests 1000 fois avant de les valider.

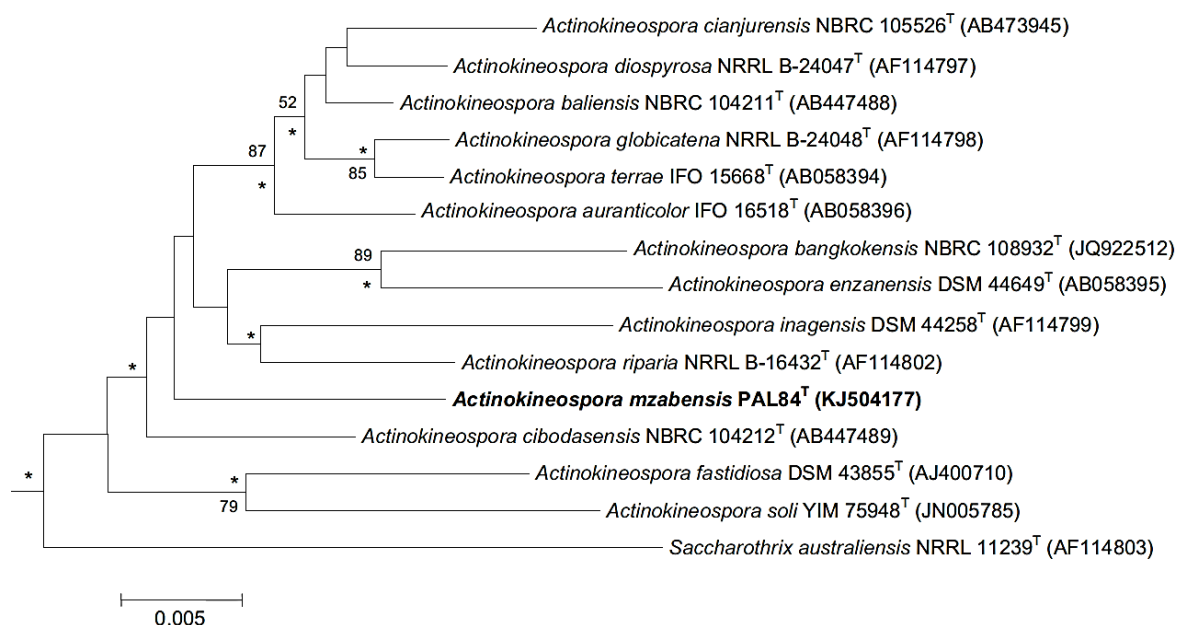


Figure 07 : Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, montrant la relation entre l'isolat PAL84 et les souches-types du genre *Actinokineospora*. (Aouiche *et al.*, 2015).

Chapitre III

Résultats et discussion

I. RESULTATS DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES ACTINOBACTERIES

Le potentiel antagoniste des treize actinobactéries a été évalué sur milieux solides ISP2 et Gélose nutritive par les techniques des stries croisées et des disques d'agar, contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c et *Listeria monocytogenes* ATCC13932.

Afin de pouvoir comparer les activités antagonistes obtenues, des qualificatifs ont été attribués à chaque activité en fonction de l'importance de la zone d'inhibition, mesuré en millimètre. Cependant ces qualificatifs dépendent de la technique employée. En effet, il est connu que la technique des stries croisées permet d'avoir de meilleures activités dans les mêmes conditions (l'actinobactérie, le milieu de culture et la durée d'incubation). Par ailleurs, la zone d'inhibition obtenue par la méthode des disques d'agar comprend 10 mm qui correspond au disque d'agar lui-même. Pour ces raisons chaque méthode lui est attribuée ses propres qualificatifs :

Les qualificatifs qui concernent la méthode des stries croisées sont :

- Activité « très importante » si le diamètre d'inhibition (DI) est supérieur à 20 mm.
- « Importante » si : $20 \text{ mm} > \text{DI} \geq 15 \text{ mm}$;
- « Moyenne » si : $15 \text{ mm} > \text{DI} \geq 10 \text{ mm}$;
- « Faible » si : $10 \text{ mm} > \text{DI} \geq 05 \text{ mm}$;
- « Très faible » si : DI est inférieur à 05 mm.

Les qualificatifs réservés à la méthode des disques d'agar sont :

- Activité « très importante » si le diamètre d'inhibition (DI) est supérieur à 30 mm.
- « Importante » si : $30 \text{ mm} > \text{DI} \geq 20 \text{ mm}$;
- « Moyenne » si : $20 \text{ mm} > \text{DI} \geq 15 \text{ mm}$;
- « Faible » si : $15 \text{ mm} > \text{DI} \geq 12 \text{ mm}$;
- « Très faible » si : $12 \text{ mm} > \text{DI} \geq 10 \text{ mm}$.

Il faut toutefois noter que ces qualificatifs sont basés sur les nombreux travaux du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbien de l'ENS de Kouba (Alger) et sont propres au laboratoire. Ils restent donc très subjectifs. En effet, il n'existe aucune norme régissant l'interprétation de ces zones d'inhibition vu la complexité et la variabilité des facteurs qui entrent en jeu (concentration de l'antibiotique sécrété inconnue, nature de l'antibiotique inconnue, type d'action inconnu...), contrairement aux disques d'antibiotiques utilisés lors de l'antibiogramme en milieu clinique.

1. Activité antibactérienne sur Gélose nutritive

Le tableau 02, ci-dessous, résume les activités antagonistes obtenues sur milieu complexe Gélose nutritive par deux méthodes (disques d'agar et stries croisées). Les résultats montrent que seules deux isolats halophiles, H58 et H62, ont présenté une activité. L'isolat H58 a montré un pouvoir antimicrobien faible (14 mm) contre *L. monocytogenes* et moyen contre *S. aureus* MRSA (16 mm) (Figure 08). H62 a montré une activité faible (13 mm) vis-à-vis de *S. aureus* MRSA.

Tableau 02 : Activité antibactérienne des treize isolats actinobactériens, évaluée sur gélose nutritive vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* MRSA par les méthodes stries croisées et disques d'agar.

Méthode des disques d'agar			
	Actinobactéries	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA
HALOPHILES	H29	-	-
	H30	-	-
	H41	-	-
	H52	-	-
	H58	14 mm	16 mm
	H61	-	-
	H62	-	13 mm
	BASOPHILES	B7	-
B8		-	-
B10		-	-
B13		-	-
THERMOPHILES	TH10	-	-
	TH28	-	-
Méthode des stries croisées			
	Actinobactéries	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA
THERMOPHILES	TH10	00	00
	TH28	00	00

- : zone d'inhibition nulle. Dans le cas de la méthode des disques d'agar, le diamètre est mesuré en millimètre dont 10 mm du disque d'agar. Dans le cas de la méthode des stries croisées, la zone d'inhibition peut être mesurée à partir de 01 mm.

2. Activité antibactérienne sur milieu ISP-2

Le tableau 03, ci-dessous, résume les activités antagonistes obtenues sur milieu complexe ISP-2 par les deux méthodes citées précédemment.

Tableau 03 : Activité antibactérienne des treize isolats actinobactériens, évaluée sur milieu complexe ISP-2 vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* MRSA par deux méthodes (stries croisées et disques d'agar).

Méthode des disques d'agar			
	Actinobactéries	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA
HALOPHILES	H29	-	-
	H30	-	-
	H41	-	-
	H52	-	-
	H58	-	-
	H61	-	-
	H62	-	-
BASOPHILES	B7	15 mm	-
	B8	-	-
	B10	22 mm	35 mm
	B13	15 mm	-
THERMOPHILES	TH10	-	-
	TH28	15 mm	13 mm
Méthode des stries croisées			
	Actinobactéries	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA
THERMOPHILES	TH10	00	00
	TH28	17 mm	14 mm

- : zone d'inhibition nulle. Dans le cas de la méthode des disques d'agar, le diamètre est mesuré en millimètre dont 10 mm du disque d'agar. Dans le cas de la méthode des stries croisées, la zone d'inhibition peut être mesurée à partir de 01 mm.

Les résultats obtenus sur milieu complexe ISP-2 sont très différents de ceux obtenus sur milieu complexe gélose nutritive. Nous constatons ici qu'il y a quatre isolats ayant présenté une activité antibactérienne. Ces activités sont les suivantes :

- L'isolat basophile B10 : avec une activité très importante (35 mm) vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* MRSA et une activité importante (22 mm) vis-à-vis *Listeria monocytogenes*. La Figure 09 illustre l'activité de l'isolat B10.
- Les isolats basophiles B7 et B13 ayant présenté chacun une activité moyenne de 15 mm contre *Listeria monocytogenes*.
- L'isolat thermophile TH28 ayant présenté une activité importante (17 mm) vis-à-vis de *Listeria monocytogenes* et une activité moyenne (14 mm) contre *Staphylococcus aureus* MRSA.

Les résultats montrent aussi que l'activité antagoniste de l'isolat thermophile TH28 a été plus importante lorsqu'elle a été mise en évidence par technique des stries croisées en comparaison avec la technique des disques d'agar.

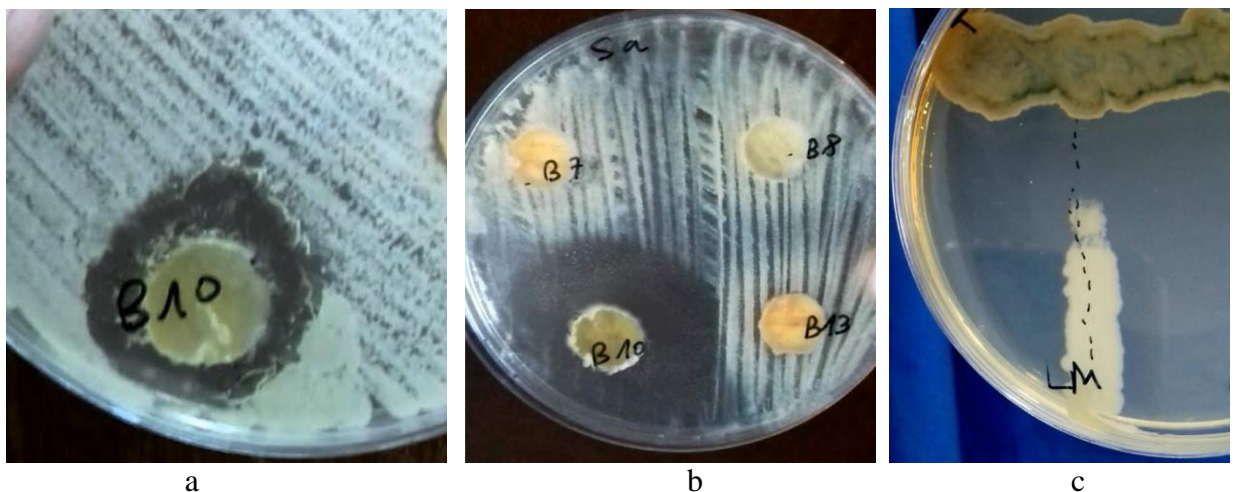


Figure 09. Photos mettant en évidence l'activité antagoniste des isolats B10 et TH28 sur milieu ISP-2. (a) : activité de B10 contre *Listeria monocytogenes* par technique des disques d'agar ; (b) : activité de B10 contre *Staphylococcus aureus* MRSA par technique des disques d'agar ; (c) : activité de TH28 contre *Listeria monocytogenes* par technique des stries croisées.



Figure 08. Photo mettant en exergue l'activité l'isolat H58 sur Gélose nutritive vis-à-vis de *Staphylococcus aureus* MRSA.

3. Comparaison des résultats et analyse des données

L'histogramme représenté en figure 10, ci-dessous, résume les activités antagonistes des isolats ayant présenté une activité. Nous pouvons constater que six isolats sur un total de treize testés ont montré une activité antagoniste (01 thermophile, 03 basophiles et 02 halophiles).

Par ailleurs, il est à constater que la plus part des isolats ont montré une activité sur le milieu ISP-2 (deux isolats seulement ont présenté une activité sur GN). Les activités les plus importantes (fortes) ont également été mises en évidence sur milieu ISP-2. Aucun isolat n'a produit des activités sur les deux milieux testés simultanément. Les isolats H58 et H62 ont montré une activité antibactérienne faible à moyenne uniquement sur gélose nutritive tandis que les isolats B7, B10, B13 et TH28 ont montré des activités moyennes, fortes à très fortes (selon les cas) uniquement sur milieu ISP-2.

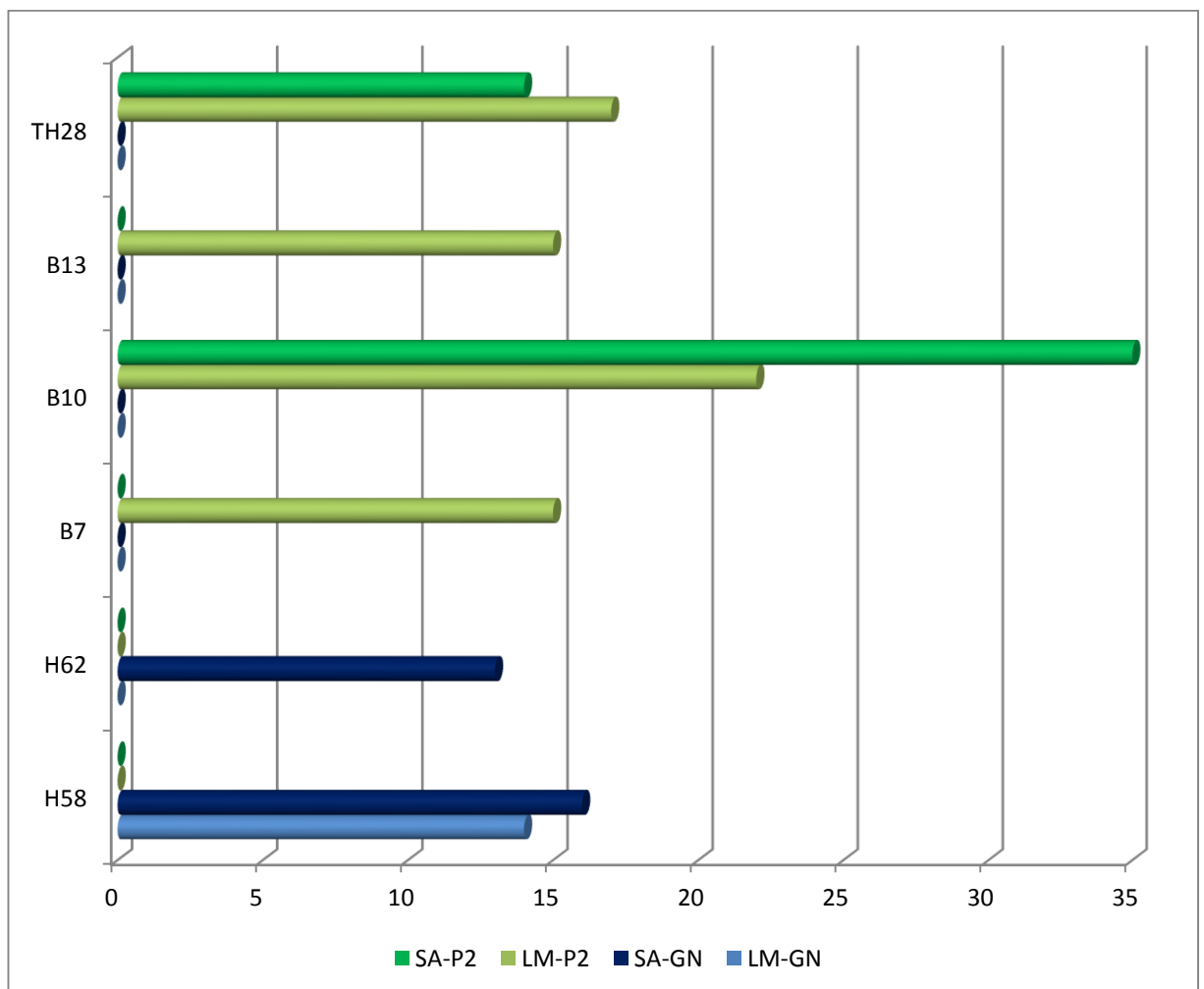


Figure 10. Histogramme montrant les activités antagonistes mises en évidence sur milieux complexes gélose nutritive (représenté en bleus) et ISP-2 (représenté en verts).

SA-P2: *Staphylococcus aureus* MRSA ayant une activité sur ISP-2 ; LM-P2 : *Listeria monocytogenes* ayant une activité sur ISP-2 ; SA-GN : *Staphylococcus aureus* MRSA ayant une activité sur gélose nutritive ; LM-GN : *Listeria monocytogenes* ayant une activité sur ISP-2.

Concernant les deux méthodes utilisées (stries croisées et disques d'agar), seule l'isolat thermophile TH28 a été testé par ces deux méthodes. Les isolats halophiles et basophiles ne peuvent pas être testés par méthode des stries croisées (explications déjà données en chapitre matériel et méthodes).

L'histogramme représenté par la figure 11, ci-dessous, montre une comparaison des activités antibactériennes de l'isolat TH28 obtenues sur milieu ISP-2 par deux méthodes différentes. Il est clairement à constater que les activités obtenues par méthode des stries croisées sont plus importantes que celles obtenues par la méthode des disques d'agar notamment lorsqu'on sait que le diamètre d'activité obtenue par cette dernière méthode comprend le diamètre du disque d'agar qui est de 10 millimètres.

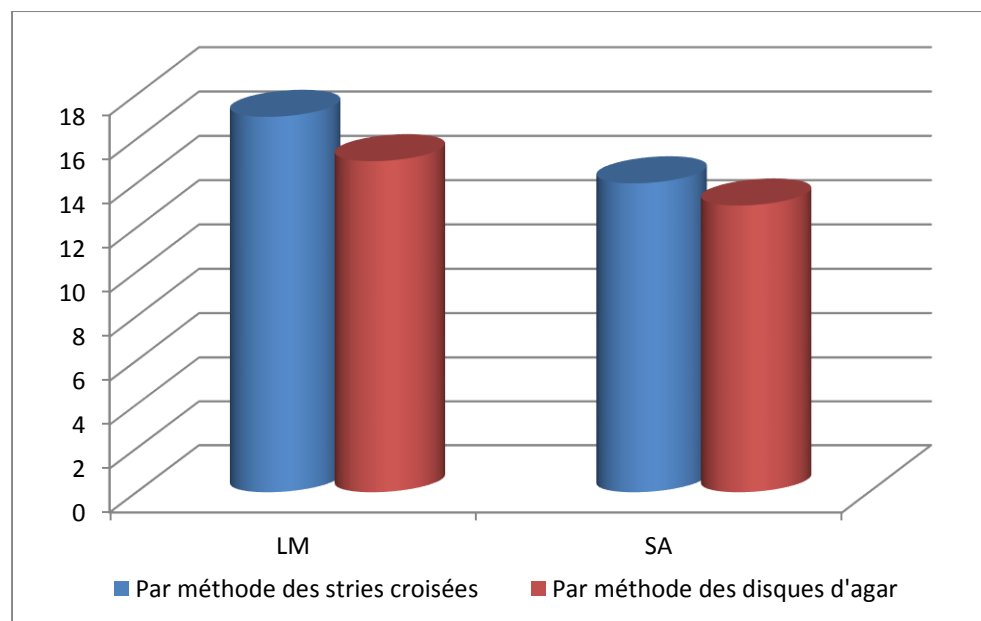


Figure 11. Histogramme montrant une comparaison des activités antagonistes, de l'isolat TH28, obtenues sur milieu ISP-2 par deux méthodes différentes (stries croisées et disques d'agar).

SA: *Staphylococcus aureus* MRSA ; LM: *Listeria monocytogenes*.

4. Durabilité et type d'action antibiotique

Cette expérience a été réalisée uniquement pour deux isolats (TH28 et B10), lesquels ont présenté de bonnes activités antagonistes. Les résultats obtenus concernant la durabilité de l'action antibiotique sont résumés dans le tableau 04, ci-dessous.

Tableau 04. Résultats du suivi des activités antagonistes des isolats TH28 et B10 durant dix jours.

Jours	Isolat TH28		Isolat B10	
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>
Jour 1	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 2	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 3	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 4	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 5	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 6	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 7	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 8	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 9	14 mm	17 mm	35 mm	-
Jour 10	14 mm	17 mm	35 mm	-

Les résultats du type d'action antibiotique (bactériostatique ou bactéricide) de ces deux isolats (TH28 et B10) n'ont révélé aucune croissance (aucun trouble) dans les bouillons nutritifs ensemencés à l'aide d'écouvillons stériles après grattage et prélèvement de la zone d'inhibition. Ces résultats montrent que les cellules qui se trouvent dans la zone d'inhibition ont été détruites (mort cellulaire). Nous pouvons donc dire que le type d'action antibiotique dans ce cas précis, pour les deux isolats, est bactéricide.

5. Discussion

Le potentiel antagoniste des treize isolats actinobactériens a été évalué sur deux milieux de culture complexes (Gélose nutritive et ISP-2) contre deux bactéries-cibles pathogènes pour l'Homme (*Staphylococcus aureus* MRSA et *Listeria monocytogenes*). Les résultats ont montré que six isolats sur treize ont présenté au moins une activité antagoniste. La meilleure activité enregistrée a été obtenue par l'isolat basophile B10 contre *Staphylococcus aureus* MRSA avec 35 mm de diamètre (très forte activité).

Les résultats obtenus, ont montré clairement que les meilleures activités antagonistes ont été obtenues sur milieu ISP-2. Ceci concorde parfaitement avec les résultats de nombreux travaux menés au Laboratoire LBSM (ENS Kouba) où le milieu ISP-2 s'est souvent montré plus favorable à la production d'antibiotiques par les actinobactéries (Zitouni, 2005; Lamari, 2006; Boudjella, 2007; Toumatia, 2010; Driche, 2010; Aouiche 2010 ; Toumatia, 2015; Lahoum, 2017; Bouznada, 2018 ; Djellal et Laref, 2018).

Par ailleurs, la Gélose nutritive a permis à deux isolats (H58 et H62) de montrer leurs activités antagonistes, certes faibles, mais qui n'ont pas été mise en exergue sur milieu ISP-2. Ceci montre le rôle du milieu de culture et sa composition dans la production des molécules antibiotiques. En effet,

différentes études publiées ont déjà montré ce phénomène. C'est le cas de *Saccharothrix algeriensis*, une actinobactérie rare capable de synthétiser divers dérivés de dithiopyrrolones en fonction des substrats disponibles dans le milieu de culture et des conditions culturelles (Zitouni, 2005).

Dans le cas des isolats H58 et H62, ces résultats révèlent probablement un potentiel caché n'ayant pas trouvé les conditions culturelles optimales pour exprimer pleinement leurs activités antagonistes. D'un autre côté, ce résultat pointe du doigt la subjectivité de ces techniques culturelles utilisées lors du screening pour sélectionner les isolats les plus actifs. En effet, les meilleures méthodes modernes utilisées actuellement pour effectuer un screening d'un potentiel antagoniste consiste à séquencer le génome entier du microorganisme et le passer au peigne fin par analyses bio-informatiques.

Pour les isolats halophiles et basophiles, le pouvoir antagoniste a été évalué par la méthode des disques d'agar uniquement, tandis que les isolats thermophiles ont été testés par deux méthodes (disques d'agar et stries croisées). Cette dernière méthode est inapplicable dans le cas des halophiles et basophiles car leurs milieux de culture qui ont été modifiés (pH= 9.0 pour les basophiles et NaCl à 10% pour les halophiles) ne permettent pas la croissance de *Staphylococcus aureus* MRSA 639c et *listeria monocytogenes* ATCC13932.

Dans le cas des isolats thermophiles, la méthode des stries croisées a permis l'obtention d'activités plus fortes que celles obtenues par la méthode des disques d'agar. Ceci est tout à fait normal vu les raisons suivantes:

- La zone d'inhibition mesurée en millimètre ne peut pas être interprétée de la même manière suivant la technique employée. En effet, 10 mm de diamètre par méthode des disques d'agar est une activité nulle puisque le diamètre du disque mesure exactement 10 mm. Par contre une zone d'inhibition de 10 mm obtenue par méthode des stries croisées est une bonne activité antagoniste.
- La concentration de l'antibiotique dans la gélose n'est pas la même. En effet, la méthode des stries croisées permet de concentrer l'antibiotique sécrété par l'actinobactérie dans la boîte puisque ce microorganisme produit durant des jours ses molécules qui s'accumulent dans le milieu. Concernant la technique des disques d'agar, une petite partie seulement de toute la quantité d'antibiotique produite par l'actinobactérie est prélevée à travers un disque d'agar. Cet échantillon antibiotique sera encore dilué dans une nouvelle boîte de Pétri où le disque d'agar sera déposé afin de permettre la diffusion des substances antibiotiques.

Le pouvoir antagoniste de la plupart des isolats étudiés lors de la présente étude a déjà été évalué lors de travaux antérieurs contre plusieurs microorganismes-cibles (bactéries et champignons) mais jamais contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* MRSA. Les résultats obtenus et comparés aux travaux antérieurs (Tableau 05) montrent que certains isolats ont un spectre d'action

très étroit mais très puissant. C'est précisément dans cet objectif que cette étude a été réalisée, car l'importance d'une activité antimicrobienne n'est pas nécessairement d'avoir un spectre d'action large. Une activité à spectre étroit ciblant une bactérie pathogène de manière très efficace est beaucoup plus intéressante. L'isolat B10 est l'exemple le plus parlant.

D'autres microorganismes qui n'ont pas montré d'activité (ou très faible) lors de la présente étude contre les deux bactéries-cibles utilisées semblent avoir par ailleurs une activité antifongique intéressante mise en évidence par les travaux antérieurs (Tableau 05). C'est le cas notamment des isolats **H29, H41 et B7**.

Tableau 05. Résultats des activités antimicrobiennes des isolats halophiles et basophiles évaluées antérieurement par méthode des disques d'agar en comparaison avec les résultats obtenus lors de la présente étude (Meklat, 2012).

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
B7	21 mm	-	16 mm	ND	ND	-	-	15 mm	-
B8	-	11 mm	-	ND	ND	-	-	-	-
B10	-	-	-	ND	ND	17 mm	03 mm	22 mm	35 mm
B13	-	-	-	ND	ND	-	-	15 mm	-
H29	-	14 mm	18 mm	-	-	-	-	-	-
H41	17 mm	-	17 mm	-	-	-	-	-	-
H58	17 mm	-	16 mm	-	-	18	15	14	16
H62	13 mm	-	14 mm	-	-	-	-	-	13

1 : *Mucor ramannianus* ; **2** : *Aspergillus niger* ; **3** : *Penicillium expansum* ; **4** : *Klebsiella pneumoniae* ; **5** : *Enterobacter cloacae* ; **6** : *Micrococcus luteus* ; **7** : *Bacillus subtilis*. **8** : *Listeria monocytogenes* ; **9** : *Staphylococcus aureus* MRSA ; ND: non déterminé ; -: activité nulle.

A propos de la durabilité (persistance) de l'action antibiotique, son interprétation implique trois paramètres à tenir en considération :

- Le type d'action (bactéricide ou bactériostatique).
- La mobilité de la bactérie-cible (mobile ou immobile).
- La stabilité et résistance de la molécule antibiotique (stable ou détérioration rapide).

La combinaison de ces trois paramètres peut conduire à 27 hypothèses. Deux exemples d'hypothèses importantes sont donnés ci-dessous :

✓ Hypothèse 1 :

- Action bactéricide: les cellules de la bactérie-cible sont mortes dans la zone d'inhibition.
- Bactérie-cible mobile : les cellules voisines (en dehors de la zone d'inhibition), encore vivantes devrait pouvoir se déplacer pour recoloniser la zone après un certain temps.
- Antibiotique stable : il reste très actif longtemps après (très stable) ce qui empêche les cellules vivantes voisines de recoloniser la zone.

✓ Hypothèse 2 :

- Action bactéricide: les cellules de la bactérie-cible sont mortes dans la zone d'inhibition.
- Bactérie-cible immobile : les cellules voisines (en dehors de la zone d'inhibition), encore vivantes resteront sur place et sont incapables de se déplacer pour recoloniser la zone.
- Antibiotique stable ou instable, les cellules vivantes voisines sont incapables de recoloniser la zone.

Dans le cas de notre étude, menée sur les isolats B10 et TH28, nous avons ce qui suit :

- Les résultats ont montré une action bactéricide dans les deux cas (B10 et TH28).
- La mobilité : *Staphylococcus aureus* est immobile. *Listeria monocytogenes* est immobile à 35 °C (mobile uniquement à 20 - 25°C) (Avril, 2000).
- Les résultats ont montré une persistance de l'action antibiotique après 10 jours d'incubation dans les deux cas étudiés.

Ces résultats correspondent au cas de l'hypothèse 2 décrite ci-dessus. Le fait que les cellules de la bactérie-cible ont été totalement tuées par l'antibiotique (dans la zone d'inhibition) et qu'en même temps la bactéries-cible est immobile, ceci empêche les cellules vivantes situées en dehors de zone d'inhibition de se déplacer pour occuper à nouveau cet espace indépendamment du fait que l'antibiotique soit stable (toujours actif) ou instable (détérioré après un certain temps).

II. RESULTATS DE L'ETUDE TAXONOMIQUE

Deux isolats d'actinobactéries uniquement ont fait l'objet de cette étude. Il s'agit des isolats H58 et H61 dont les séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S étaient disponibles. Les résultats de l'étude morphologique puis l'analyse phylogénétique sont donnés ci-dessous.

1. Caractéristiques macro et micromorphologiques

D'après les caractéristiques morphologiques et culturelles des résultats obtenus, les deux isolats H58 et H61 peuvent être classés dans le même groupe en raison de leurs caractéristiques très proches. La description de l'étude micromorphologique est donnée ci-dessous:

L'étude micromorphologique des deux isolats (H58 et H61) a montré qu'ils sont caractérisés par un mycélium aérien ramifié et fragmenté de manière anarchique en éléments plus ou moins longs, immobiles ayant des chaînes de spores en zigzag. Ces spores sont parfois enveloppées par une gaine. Le mycélium du substrat se fragmente parfois. (Figure 12)

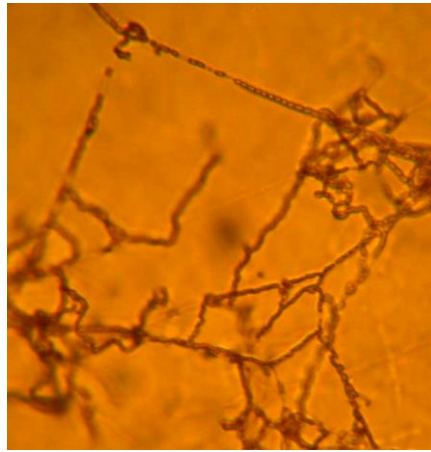


Figure 12. Micromorphologie de l'isolat H58 poussant sur milieu ISP-2 observée sous microscope optique au grossissement G 10 X 40.

L'étude macromorphologique a révélé que les deux isolats présentent un mycélium aérien blanc à blanc jaunâtre et un mycélium de substrat jaunâtre sur milieu ISP-2. Aucun pigment diffusible n'a été produit par les deux isolats sur le même milieu. La Figure 13, ci-dessous, montre une photo de l'aspect macromorphologique des deux isolats.



Figure 13. Macromorphologie des isolats H58 (à gauche) et H61 (à droite) poussant sur milieu ISP-2.

2. Résultats de l'étude phylogénétique

Les résultats du Blast ont montré que les deux isolats H58 et H61 appartiennent au genre *Nocardiopsis*. Ceci concorde avec les résultats de l'étude micromorphologique. Les résultats basés sur l'analyse de l'ADNr16S ont rapprochés l'isolat H58 de l'espèce *Nocardiopsis litoralis* avec un taux de similarité de 99,9%, et l'isolat H61 de l'espèce *Nocardiopsis xinjiangensis* avec un taux de similarité de 99,6 %. (Tableaux 06 et 07).

La Figure 14 illustre l'arbre phylogénétique montrant la relation qui existe entre l'isolat H58 et H61 et les autres espèces du genre *Nocardiopsis*.

Tableau 06. Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de la souche H58 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Nocardiopsis*.

N°	Nom d'espèces	Souche-type	N° de la séquence	% de similarité avec H58
1	<i>N. litoralis</i>	JSM 073097 ^T	EU583726	99,9
2	<i>N. kunsanensis</i>	HA-9 ^T	AF195412	99,6
3	<i>N. xinjiangensis</i>	YIM 90004 _T	AF251709	98,5
4	<i>N. salina</i>	YIM 90010 _T	AY373031	98,2
5	<i>N. aegyptia</i>	DSM 44442 _T	AJ539401	97,8
6	<i>N. nikkonensis</i>	YU1183-22 _T	AB491226	97,6
7	<i>N. lucentensis</i>	DSM 44048 _T	X97888	97,6
8	<i>N. alba</i>	DSM 43377 _T	X97883	97,5
9	<i>N. dassonvillei</i>	DSM 43111 _T	ABUI01000017	97,5
10	<i>N. prasina</i>	DSM 43845 _T	X97884	97,1
11	<i>N. ganjiahuensis</i>	HBUM 20038 _T	AY336513	97,1

Tableau 07. Résultat du blast des séquences de l'ADNr 16S de la souche H61 avec les souches-types des espèces les plus proches du genre *Nocardiopsis*.

N°	Nom d'espèces	Souche-type	N° de la séquence	% de similarité avec H58
1	<i>N. xinjiangensis</i>	YIM 90004 _T	AF251709	99,6
2	<i>N. litoralis</i>	JSM 073097 ^T	EU583726	98,5
3	<i>N. kunsanensis</i>	HA-9 ^T	AF195412	98,2
4	<i>N. salina</i>	YIM 90010 _T	AY373031	98,2
5	<i>N. nikkonensis</i>	YU1183-22 _T	AB491226	97,6
6	<i>N. aegyptia</i>	DSM 44442 _T	AJ539401	97,3
7	<i>N. lucentensis</i>	DSM 44048 _T	X97888	97,1
8	<i>N. dassonvillei</i>	DSM 43111 _T	ABUI01000017	97,1
9	<i>N. alba</i>	DSM 43377 _T	X97883	96,8
10	<i>N. ganjiahuensis</i>	HBUM 20038 _T	AY336513	96,5
11	<i>N. prasina</i>	DSM 43845 _T	X97884	96,3

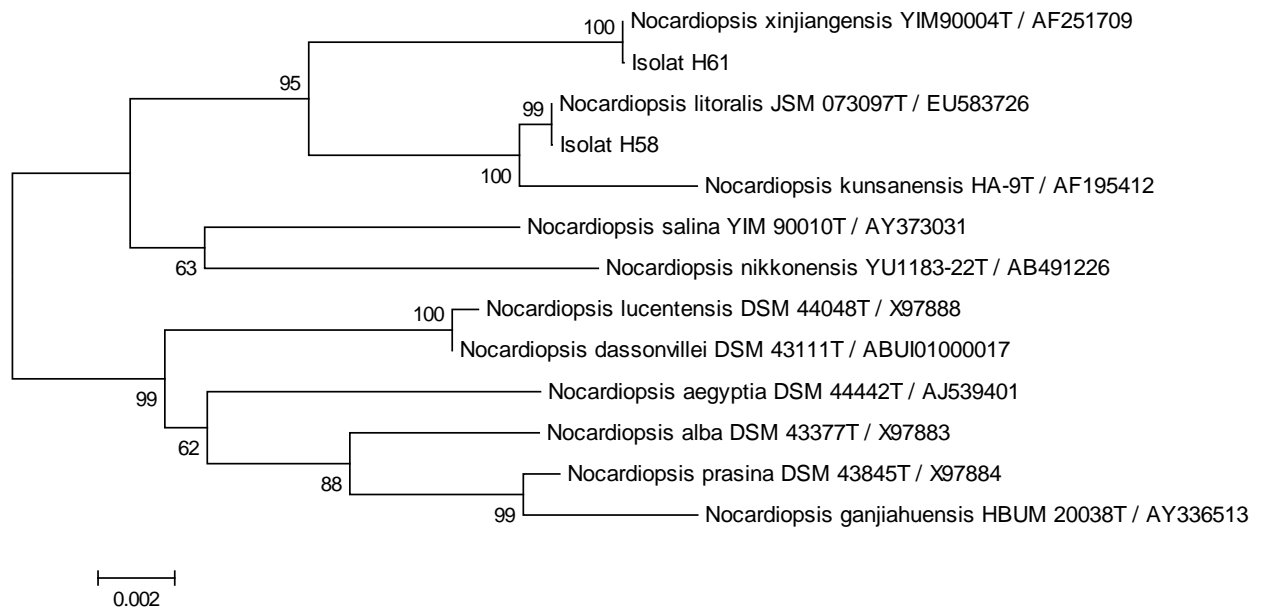


Figure 14. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences de l'ADNr 16S et montrant la relation entre les isolats H58, H61 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Nocardiopsis*.

Note: Les nombres figurant au niveau des nœuds indiquent les taux du « bootstrap » (exprimés en pourcentage de 1000 re-échantillonnages).

3. Discussion

Lors de l'étude micromorphologique, les deux isolats étudiés ont été rattachés de manière présumptive au groupe des genres *Nocardiopsis*, *Nocardia* et *Saccharothrix*. En effet, ces genres présentent une micromorphologie similaire avec un mycélium de substrat qui se fragmente.

L'analyse des séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S a permis d'une part de confirmer l'appartenance de ces deux isolats au genre *Nocardiopsis* et d'autre part déterminer les espèces les plus proches. En effet, l'isolat H58 est proche de *Nocardiopsis litoralis* avec un taux de similarité de 99,9% et H61 est proche de *Nocardiopsis xinjiangensis* avec un taux de similarité de 99,6 %.

Par ailleurs, ces taux de similarité très élevés ne signifient pas que ces isolats sont identifiés avec certitude comme étant *N. litoralis* et *N. xinjiangensis*. En effet, il faut savoir que plusieurs espèces bien différentes peuvent avoir entre elles un taux de similarité de l'ADNr 16S qui avoisine les 100% voire parfois 100%. A titre d'exemple *Actinosynnema nirum* et *Actinosynnema pretiosum*, *Streptomyces viridodiastaticus* et *Streptomyces albogriseolus*, *Lechevaliera atacamensis* et *Lechevaliera deserti*. Ceci s'explique par le fait que l'analyse de l'ADNr16S est basée seulement sur un échantillon du génome et non pas sur l'information du génome entier. Il est donc nécessaire de réaliser l'hybridation ADN-ADN qui seule permettra de statuer sans aucune ambiguïté sur la position taxonomique des souches étudiées.

Conclusion et Perspectives

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

La recrudescence de la résistance microbienne aux antibiotiques est un phénomène inquiétant qui ne cesse de prendre de l'ampleur. Dans ce cadre les chercheurs établissent des stratégies de recherche de nouvelles molécules antibiotiques. Parmi ces stratégies, les antibiotiques d'origine naturelle produits par les microorganismes. Les actinobactéries extrêmophiles constituent une source très intéressante de ces molécules. Leur métabolisme complexe permettant à la bactérie de vivre dans des conditions extrêmes pourrait être à l'origine de molécules originales synthétisées par voies métaboliques complexes inconnues.

La présente étude a permis de mettre en exergue le pouvoir antagoniste de six isolats actinobactériens d'origine saharienne contre *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* résistante à la méticilline. Les tests ont été réalisés par les méthodes des stries croisées et des disques d'agar sur deux milieux de culture complexes : ISP-2 et gélose nutritive.

Les résultats ont révélé des activités intéressantes et les deux meilleurs isolats retenus sont l'isolat basophile B10 et l'isolat thermophile TH28.

Sur le plan taxonomique, les deux isolats, H58 et H61, ayant fait l'objet d'une étude morphologique et phylogénétique ont été rattachés respectivement aux espèces *Nocardiopsis litoralis* avec un taux de similarité de 99,9% et *Nocardiopsis xinjiangensis* avec un taux de similarité de 99,6 %.

Les résultats obtenus sont intéressants et ouvrent des perspectives multiples :

- Elargir le screening sur plusieurs milieux de culture de composition différente afin de révéler les éventuelles potentialités antagonistes cachées des isolats.
- Evaluer le potentiel antagoniste contre un plus large éventail de germes-cibles pathogènes pour l'Homme, les animaux et les plantes.
- Optimiser la synthèse antibiotique des actinobactéries par la recherche des meilleures conditions culturelles sur milieux de culture minéraux.
- Produire et extraire les antibiotiques et déterminer leur CMI.

Références bibliographiques

REFERENCES

- Aggoune-Khinache N, Bensersa D, Henniche FZ, Daoudi M, Abdouni MA, Chabani A, Tiouit D, Naim M (2008) Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med Mal Infect* 39:413–414.
- Anzai Y., Kim H., Park J.Y., Wakabayashi H. and Oyaizu H. (2008). - Phylogenetic affiliation of the pseudomonads based on 16S rRNA sequence. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, 50, 1563-1589.
- 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., 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.
- Avril JL, Dabernat H, Denis F, Monteil H (2000) Bactériologie clinique, 3ème édition, Ellipses-Marketing. 602 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* 34:403–41.
- Badji B, Riba A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N (2005) Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J Med Myco* 15:211–219.
- Badji B, Zitouni A, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N (2006) Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp., AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol* 52:373–382.
- Baltz RH (2007) Antimicrobials from Actinomycetes: *Back to the Future*. *Microbe* 2:125–131.
- Berdy J. (2005). - Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiotics* 58, 1–26.
- Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K.L. (1987). - CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1, 2, 3. Florida, USA. *CRC Press*, Boca Raton.
- 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. 2ème édition, Springer, New York. 1750 p.

- Bind J.L., Delaval J. Les listérioses. *Bull. Soc. Vét. Prat. de France*, 1994, 78, 387-407.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Schumann P., Spröer C., Klenk HP., Sabou N.(2015) *Saccharothrix tamanrassetensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Saharan soil in Algeria. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 65(4). 1316-1320.
- Boubetra D, Sabaou N, Zitouni A, Bijani C, Lebrihi A, Mathieu F (2012) Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by *Saccharothrix SA198* isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res* 168(4):223–30.
- Boubetra D, Zitouni A, Bouras N, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013a) *Saccharothrix hoggarensis* sp. nov. à novel actinomycete isolated from Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol* 63:549–553.
- Boubetra D, Zitouni A, Bouras N, Mathieu F, Lebrihi A, Schumann P, Spröer C, Klenk HP, Sabaou N (2013b) *Saccharothrix saharensis* sp. nov., a novel actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. *Int J Syst Evol Microbiol*. Doi: 10.1099/ijs.0.051839-0.
- Boudjella H (2007) Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. 188 p.
- Bouras N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Schumann P., Spröer C., Sabou N., Klenk H.P. (2015) *Nocardiopsis algeriensis* sp. nov., an alkalitolerant actinomycete isolated from saharan soil. *Antonie van Leeuwenhoek*, 107(2).313-320.
- Bouti K (1997) Les genres rares Planomonospora, Planobispora, Spirillospora et Streptosporangium (Actinomycetales) dans les sols sahariens; taxonomie numérique et étude de quelques-uns de leurs antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. 149 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. 33–70.
- 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.

- Demain A.L. (2006) From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind Microbiol Biotechnol* 33:486–495.
- Demain. A. L. (2006). - From natural products discovery to commercialization: a success story. *J Ind. Microbiol. Biotechnol.* 33: 486-495.
- Dgigal. (2003).interaction entre la communauté microbienne du sol (bactéries et champignons mycorhiziens) et les nématodes bactériivors :effet sur la nutrition minérale et la croissance de différentes plantes .Thèse doc :université Chikh Anta Diop De Dakar.Pp.157.
- Djellal et Laref, (2018) Étude taxonomique et mise en évidence du pouvoir antagoniste de quelques souches bactériennes. Mémoire de Master 2. Université de Khemis Meliana. 53 P.
- Driche E (2010) Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS Kouba, Alger.
- Ensign, J.C.,Normand ,P.,Burden ,J.P.,& Yallop, C. A. (1993).Physiology of some actinomycetes genera. *Research in microbiology* , 144(8), 657-660.
- Etzel R.A. (2002).- Mycotoxins. *J.A.M.A.* 287 (4), 425-427.
- Fauchere JL, Avril JL (2002) Bactériologie générale et médicale. Ellipses, pp: 105–111.
- Felsenstein J. (1985). – Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evol*, 39, 783-791.
- 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.
- 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.
- 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.
- Gillian M., Roderick J. Hay., Yonne M. Clayton. (1998).- Atlas de poche de mycologie, p. 60-70.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse HJ., Trujillo ME., Suzuki, K., Ludwig W., Withman WB. (2012). *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria (2èmeEds)* vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083 p.
- Gottlieb D. 1973.Generalconsideration and implication of actinomycétales.in actinomycétalescharacteristics and pratical importance.edited by G syks and F.A skinner.academic press,London newyork.
- Hendry K.H. and Cole E.C. (1993). - A review of mycotoxins in indoor air. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38 (2), 183-98.

- 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.
- Huet J. (1999).- Généralités sur les médicaments antifongiques. *In: principaux antifongiques et antiparasitaires. Tome 1: Antifongiques. Traité de chimie thérapeutique. Vol. 5. Techniques et Documentation. Paris.*
- Ji-Guang D, Qing-Feng S, Ke-Cheng L, Ming-Hua Z, Xiao-Hui M, Wu N, Liang H, Jin-Xian Y, et al. (2009) Retrospective analysis of nosocomial infections in the intensive care unit of a tertiary hospital in China during 2003 and 2007. *BMC Infect Dis*. Doi:10.1186/1471-2334-9-115.
- Jonge B.L.M.; Tomasz A. (1993) Abnormal Peptidoglycan Produced in a Methicillin-Resistant Strain of *Staphylococcus aureus* Grown in the presence of Methicillin: Functional Role for Penicillin-Binding Protein 2A in Cell Wall Synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*. 37(2): 342–346.
- Jose PA, Jebakumar SRD (2013) Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbi*, Doi: 10.3389/fmicb.2013.00240.
- 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, 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.
- 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.
- 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.
- 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 (2002a) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological activities. *J Antibiot* 55(8):696–701.

- Lamari L, Zitouni A, Dob T, Sabaou N, Lebrihi A, Germain P, Seguin E, Tillequin F (2002b) New dithiolopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J Antibiot* 55(8):702–707.
- 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..
- Larpent. J.P; et Sanglier. J.J. (1989). – Biotechnologies des antibiotiques. Masson. Paris, p. 481.
- 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. 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 M.P., De Bievre C. and Lechevalier H.A. (1977).- Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.
- Ludwig W, Euzéby J, Schumann P, Busse H-J, Trujillo ME, Kämpfer P, Whitman WB. (2012). Road map of the phylum *Actinobacteria*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*, 2nd ed. (eds Goodfellow M, Kämpfer P, Busse H-J, Trujillo ME, Suzuki K-I, Ludwig W, Whitman WB, editors), pp. 1–28 New York: Springer.
- Meier-Kolthoff JP, Auch AF, Klenk HP, Göker M (2013) Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions. *BMC Bioinformatics* 14:60.
- Meklat A. ; Bouras N. ; i Zitouni A.; Mathieu F.; Lebrihi A.; Schumann P.; Spröer C.; Klenk H.; Sabaou N. (2012). *Actinopolyspora algeriensis* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from a Saharan soil. 773p.
- Merrouche R., Bouras N, Coppel Y, Mathieu F, Monje MC, Sabaou N, Lebrihi A (2010) Dithiolopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J Nat Prod* 73:1164–1166.
- Messai Y., Ibadene 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.
- Mostefaoui A. (1996) Taxonomie numérique appliquée aux *Actinomadura*, *Microtetraspora* et *Herbidospira* (Actinomycètes) isolés des sols sahariens; production, extraction, purification et caractérisation partielle de quelques antibiotiques. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.

- 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.
- Natalia A. and Manucharova, (2006) - Microbial Habitat: evolution, structure and distribution in soils. 18^{ème} congrès de la science des sols, Philadelphie
- Nekhili H. (1996) Classification numérique des genres *Actinoplanes*, *Couchioplanes* et *Micromonospora* (Actinomycetales) isolés des sols des zones arides algériennes. Purification et caractérisation partielle des principales molécules antifongiques synthétisées. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.
- Nouasri A. (1996) Les genres *Microellobosporia*, *Saccharomonospora*, *Thermoactinomyces* et *Thermomonospora* (Actinomycetales) dans les sols sahariens: taxonomie numérique, production, purification et caractérisation partielle des principaux antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, E.N.S. de Kouba (Alger). 124 p.
- 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.
- Prescott LM, Harley JP, Klein DA, Bacq-Calberg CM, Dusart J (2002) Microbiologie. De Boeck Université. 1147 p.
- Promnuan Y., Kudo T., Ohkuma M. and Chantawannakul P. (2011). *Actinomadura apis* sp. nov., isolated from a honey bee (*Apis mellifera*). hive, and the reclassification of *Actinomadura cremea* subsp. *Rifamycini*.
- Quincampoix J.C. and Mainardi J.L. (2001). - Mécanismes de résistance des cocci à Gram positif. *Réanimation.*, 10, 267-75.
- Räty K, Kantola J, Hautala A, Hakala J, Ylihonko K, Mantsala P (2002) Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene* 293:115–122.
- Rheims H., Felske A., Seufert S., and Stackebrandt S. (1999).Molecular monitoring of an uncultured group of the class *Actinobacteria* in two terrestrial environments. *Journal of microbiology methods*, 36(1-2) 65-75.
- Roberts M.C. (1998) - Antibiotic resistance mechanisms in bacteria of oral and upper respiratory origin. *Int. J. Antimicrob. Agents.* 9, 255–267.
- 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, 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.
- 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. (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. et 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.
- Saitou N and Nei M. (1987) - The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.*, 4, 406-425.
- Sanglier JJ (1990) Mycotoxines, mycoses et mycoallergies. *In*: Botton B (Ed). Moisissures utiles et nuisibles: Importance industrielle. 2ème édition, Mason, Paris. pp: 437–453.
- Schleifer, K.H., et Ludwig, W. (1989). Phylogenetic relationships of bacteria. The hierarchy of life. Sous la direction de : B. Fernholm, K. Bremer et H. Jörnvall. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. pp. 103–117.
- Shirling EB, Gottlieb D (1966) Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol* 13:313–340
- Shomura T., J. Yoshida J., Amano S., Kojima M., Inouye S. and Niida T. (1979) Studies on Actinomycetales producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *The Journal of Antibiotics* 32(5):427-35.
- Sokolovska I., Rozenberg R., Riez C., Rouxhet P.G., Agathos S.N., Wattiau P.(2003). Carbon Source-induced modification in mycolic acid content and cell wall permeability of *Rhodococcus erythropolis*. *El. Application. Environnement. Microbiology*, 69,701.
- Solanki R, Khanna M, Lal R (2008) Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J Microbiol* 48:410–431.
- Solecka J, Zajko J, Postek M, Rajnisz A (2012) Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent Eur J Biol* 7:373–390.
- 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.

- Stackebrandt, E., et Goebel, B.M. (1994). Taxonomic note: A place for DNA–DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 44(4) : 846–849.
- Takahashi Y, 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, de 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* 27:397–402.
- 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 essais 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.
- Valan Arasu .M, Duraipandiyan .V, Agastian .P, Ignacimuthu.S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from Western Ghats of Tamil Nadu. *J. Mycol. Méd.*, 18, 147-153.
- Vandamme E.J. (1985).- Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences. Vol. 22. New-York. Marcel Dekker. p 808.
- 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 E. M., Ul-Hassan A. (2009). - *Actinobacteria*. Encyclopedia of Microbiology (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.
- Wellington EM, Ul-Hassan A (2009) Actinobacteria. *In*: Moselio, Schaechter (Ed). Encyclopedia of Microbiology. Elsevier, Oxford. pp. 26–44.
- Williams P.G. (2009). - Panning for chemical gold: marine bacteria as a source of new therapeutics. *Trends Biotechnol.*, 27, 45-52p.

- Yala D., Merad A.S., Mohamedi D. and Ouar Korich M.N. (2001). - Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb*, 91, 5-12.
- Zaitlin B.; Watson S.B., (2006). *Actinomycetes* in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. 40 (9), 1741-1753.
- 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.
- Zebiri S (1997) Les actinomycètes du groupe des nocardioformes dans les sols sahariens: isolement sélectif, classification numérique, purification et caractérisation des principaux antibiotiques synthétisés. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger.
- Zitouni A (1995) Les genres *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (Actinomycetales) dans les sols sahariens: taxonomie numérique; extraction, purification et caractérisation de quelques antibiotiques synthétisés. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba. 177 p.
- Zitouni A, Boudjella H, Lamari L, Badji B, Mathieu F, Lebrihi A, Sabaou N (2005) *Nocardiopsis* and *Saccharothrix* genera in Saharan soils in Algeria: isolation, biological activities and partial characterization of antibiotics. *Res Microbiol* 156(10):984–993.
- Zitouni A, Boudjella H, Mathieu F, Sabaou N, Lebrihi A (2004b) 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, Lamari L, Boudjella H, Badji B, Sabaou N, Gaouar A, Mathieu F, Lebrihi A, Labeda DP (2004a) *Saccharothrix algeriensis* sp. nov., isolated from Saharan soil. *Int Syst Evol Microbiol* 54:1377–1381.

ANNEXE

Annexe**Composition des milieux de culture utilisés****1/ Milieu GN (gélose nutritive)**

Extrait de Viande	1,0 g/L
Extrait de levure	2,5 g/L
Peptone	5,0 g/L
Chlorure De Sodium (NaCl)	5,0 g/L
Eau distillée	1000 mL
Agar	18 g/L
pH	7,3

2/ Milieu ISP-2

Extrait de Malt	10 g/L
Extrait de levure	4.0 g/L
Glucose	4.0 g/L
Eau distillée	1000 mL
Agar	18,0 g/L
pH	7,3

3/ Milieu PCA (Plate Counte Agar)

Tryptone.....	6,0 g
Extrait de levure.....	2,5 g
Glucose.....	1,0 g
Eau distillée	1000 mL
Agar.....	15,0 g
pH	7,3