

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA
RECHERCHE SCIENTIFIQUE
UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1
FACULTE DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DEPARTEMENT DE BIOLOGIE ET PHYSIOLOGIE CELLULAIRE



Mémoire de fin d'étude

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en sciences de la nature et de la vie
OPTION: MICROBIOLOGIE
Réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), ENS de Kouba
PAR
ARAB Sakina et KABAZ Nabila
Master domicilié au laboratoire de biotechnologie, environnement et santé

Effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques par la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. isolée d'un sédiment marin de Tipaza

Soutenu le 02/07/2018

Devant le jury composé de:

M ^{me} BOUDJEMAA N.	MCB USDB 1	Présidente
M ^{me} AIT SAADI N.	MAA USDB 1	Examinatrice
M ^{me} MEKLAT A.	MCA USDB 1	Promotrice
M ^r YEKKOUR A.	MRA INRAA	Co-promoteur

Année universitaire: 2017 – 2018

Remerciements

Nous tenons tout d'abord à remercier Allah le tout puissant pour nous avoir accordé la volonté et la patience pour aller jusqu'au bout, pour nous avoir guidé sur le droit chemin tout au long de ce n'aurait pas aboutit.

A Monsieur SABAOU Nasserline, directeur de laboratoire de biologie des systèmes microbiens de l'ENS de Kouba-Alger, nous le remercions pour la confiance qu'il nous a accordée en nous accueillant et pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de notre travail. Sa patience, sa curiosité scientifique, sa rigueur sont pour nous un exemple dans le domaine de la recherche. Qu'il accepte ici le témoignage de notre profonde gratitude.

Un immense merci à notre encadrante, Madame MEKLAT Atika, notre main lucrative pour nous avoir dirigé dans ce travail, pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques, pour son extrême gentillesse, sa disponibilité, son aide et son accueil ainsi que pour ses qualités humaines et scientifiques exceptionnelles qui ont toujours été au service des autres. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Nous remercions vivement Monsieur YEKKOUR Amine, qui était le co-promoteur de notre mémoire de master. Merci beaucoup pour votre soutien, votre méthodologie de travail, vos capacités scientifiques et surtout votre bonne humeur permanente.

A Madame BOUDJEMAA Nouara pour l'honneur que vous nous avez fait, en acceptant de présider le jury. Veuillez trouver ici, l'expression de notre reconnaissance et de notre respect le plus sincère.

Nous remercions Madame AIT SAADI Nacera qui nous a fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Nous tenons à remercier chaleureusement Madame KACI Sonia (ingénieur de LBSM) pour la bonne gestion continue du laboratoire et des équipements, ainsi que pour sa qualité humaine, sa gentillesse absolue et sa simplicité, à qui nous sommes très reconnaissantes.

A tous les membres du laboratoire LBSM, pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et leur sympathie, notre profond respect et notre reconnaissance.

Enfin, notre profonde reconnaissance à toute personne qui a participé de près ou de loin à l'élaboration de ce travail.

Dédicaces

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

Je dédie affectueusement ce travail :

A mes très chers parents, Mohammed et Djerboua Farida

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je vous porte, ni la profonde gratitude que je vous témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez que dieu vous procure bonne santé et longue vie.

A mes chers et adorables Sœurset frère Rekia, Ikram et Mohammed Amine

Je vous souhaite une vie pleine de bonheur et de succès et que dieu, le tout puissant, vous protège et vous garde.

A mes grands pères et grands mères ainsi qu'à tout membre de ma famille petit et grand.

A toute mes amies, j'oublierai a jamais votre aide et je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A toutes les personnes qui ont participées a l'élaboration de ce travail, a tous ceux que j'ai omis de citer

Sakina

Dédicaces

Au nom d'ALLAH le clément et le miséricordieux salut et paix sur le fidèle message d'Allah

Je dédie ce modeste travail :

A mes très chers parents, qui m'ont tant offert sans jamais se lasser, qui m'ont transmis le désir d'apprendre et m'ont toujours accompagné tout au Long de mes études avec leur amour, leur soutien, leur compréhension et leurs encouragements, et m'ont permis de devenir ce que je suis, avec tout mon amour et ma reconnaissance.

A mes chers et adorables frères Fethi, Adel et Islam avec une profonde tendresse.

A toute la famille, dans le sens large au terme, pour leur soutien qui m'a été fort précieux

A toute mes amies, j'oublierai a jamais votre aide et je vous dédie ce travail avec tous mes vœux de bonheur, de santé et de réussite.

A l'ensemble des professeurs qui m'ont suivi durant mes années d'études, de primaire jusqu'à l'université témoignage de ma reconnaissance aux efforts qu'ils ont consentis en ma faveur, j'espère qu'ils trouveront dans ce mémoire toute ma sympathie

A toutes les personnes qui ont participées a l'élaboration de ce travail, a tous ceux que j'ai omis de citer

Nabila

Table des matières

Résumé

Abstract

ملخص

Introduction 1

Synthèse bibliographique

1. Définition des actinobactéries	3
2. Distribution des actinobactéries	3
2.1. Sol	3
2.2. Milieu marin	4
2.3. Faune, flore et Homme	5
3. Données sur le genre <i>Actinomadura</i>	5
3.1. Caractéristiques du genre <i>Actinomadura</i>	5
3.2. Distribution du genre <i>Actinomadura</i>	7
4. Antibiotiques	7
4.1. Définition des antibiotiques	7
4.2. Classification des antibiotiques	7
4.3. Spectre d'action des antibiotiques	7
4.4. Mode d'action des antibiotiques	9
4.4.1. Mode d'action des antitibiotiques antibactériens	9
4.4.2. Mode d'action des antibiotiques antifongiques	10
5. Rôle des actinobactéries dans la production des antibiotiques	10
6. Antibiotiques produits par certaines espèces d'<i>Actinomadura</i>	11
7. Résistance aux antibiotiques	12
8. Recherche de nouvelles molécules antibiotiques	13
9. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques par les actinobactéries	14
9.1. Facteurs nutritionnels	14
9.2. Inoculum	15
9.3. Facteurs physico-chimiques	15

Matériel et méthodes

I. Matériel	17
1. Souche d'actinobactérie	17
2. Souches de microorganismes-cibles	17
II. Méthodes	18
1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche TAS18 d'<i>Actinomadura</i> sp. sur milieu solide	18
2. Cinétiques de production des antimicrobiens de la souche TAS18 en milieu liquide	19
2.1. Milieux de culture	19
2.2. Préparation des pré-cultures	19
2.3. Préparation des cultures	21
2.4. Mesure de la croissance	21
2.5. Mesure de l'activité antimicrobienne	21

3. Extraction des antimicrobiens	22
3.1. Extraction à partir du filtrat de culture	22
3.2. Antibiographie	22
4. Analyse par HPLC	23
4.1. Appareillage	24
4.2. Conditions expérimentales	24
Résultats et discussion	
I. Résultats	25
1. Evaluation de l'activité antagoniste de la souche TAS18 d'Actinomadura sp. sur milieu solide	25
2. Cinétiques de production des antimicrobiens en milieux liquides	26
1.1. Cinétique de production en milieu ISP2	26
1.2. Cinétique de production en milieu semi-synthétique	26
1.3. Cinétique de production en milieu synthétique	29
3. Extraction des antimicrobiens	31
4. Analyse par HPLC	32
II. Discussion	34
Conclusion et perspectives	39
Références bibliographiques	41
Annexe	53

Liste des figures

	Page
Figure 1. Micromorphologie de trois espèces d' <i>Actinomadura</i>	6
Figure 2. Cibles majeurs des antibiotiques antibactériens	10
Figure 3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche TAS 18 par la méthode des cylindres d'agar	18
Figure 4. Schéma du protocole des cinétiques de production des antibiotiques.	20
Figure 5. Schéma descriptif des étapes de l'extraction	23
Figure 6. Activité antagoniste de la souche TAS18	25
Figure 7. Cinétiques de production des substances antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 d' <i>Actinomadura</i> sp. cultivée dans le milieu ISP2.	26
Figure 8. Activité antibactérienne de la souche TAS18 d' <i>Actinomadura</i> sp. cultivée dans le milieu semi-synthétique additionné de glucose contre <i>Listeria monocytogenes</i> par la méthode de diffusion des puits	27
Figure 9. Cinétiques de production des substances antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 d' <i>Actinomadura</i> sp. cultivée dans le milieu semi-synthétique avec différentes sources de carbone.	28
Figure 10. Activité antibactérienne de la souche TAS18 d' <i>Actinomadura</i> sp. cultivée dans le milieu synthétique additionné de glucose contre <i>Listeria monocytogenes</i> par la méthode de diffusion des puits	29
Figure 11. Cinétiques de production des substances antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 d' <i>Actinomadura</i> sp. cultivée dans le MS avec différentes sources de carbone.	30
Figure 12. Activité antibactérienne des différents extraits de la phase organiques à partir des milieux MS et MSS additionnés de glucose contre <i>Klebsiella pneumoniae</i> (à droite) et <i>Listeria monocytogenes</i> (à gauche)	32
Figure 13. Profil d'élution en HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche TAS 18 d' <i>Actinomadura</i> cultivée pendant 3 jours à 30°C et 250 rpm sur le milieu MSS additionné de glucose	33
Figure 14. Profil d'élution en HPLC de l'extrait au dichlorométhane de la souche TAS 18 d' <i>Actinomadura</i> cultivée pendant 4 jours à 30°C et 250 rpm sur milieu MS additionné de glucose	33

Liste des tableaux

	Page
Tableau 1. Principaux antibiotiques et leur classification.	8
Tableau 2. Liste des antibiotiques produits par certaines espèces du genre <i>Actinomadura</i>	12
Tableau 3. Liste de microorganismes-cibles testés	17
Tableau 4. Activités antimicrobiennes des extraits organiques des filtrats de culture de la souche TAS18	31

Liste des abréviations

HPLC	High performance liquid chromatography
ISP2	International Streptomyces project
LBSM	Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
MH	Mueller-Hinton
MS	milieu synthétique
MSS	milieu semi-synthétique
NRRL	Northern Regional Research Center
PDA	Potato dextrose agar
rmp	Rotation Par Minute

Résumé

Le présent travail s'intéresse à l'étude de l'effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antibiotiques par une souche d'actinobactérie, *Actinomadura* sp. TAS18, isolée d'un sédiment prélevé de la région de Tipaza. Le but de ce travail consiste en la recherche d'un milieu de culture favorable à cette production.

L'évaluation de pouvoir antagoniste de la souche TAS18 par la méthode des cylindres d'agar a montré que cet isolat est doté d'une activité intéressante (les diamètres d'inhibition oscillent entre 20 et 32 mm) et variée, qui s'étend sur des champignons filamenteux, des bactéries à Gram positif et des bactéries à Gram négatif; témoignant ainsi de son large spectre d'action.

La recherche d'un milieu favorable pour la production des antibiotiques a été réalisée en suivant des cinétiques de production en milieux de culture semi-synthétique renfermant l'extrait de levure et le sulfate d'ammonium comme sources d'azote et en milieu synthétique qui contient le sulfate d'ammonium comme seule source d'azote tout en testant différentes sources de carbone tel que le glucose, le saccharose, l'amidon, la dextrine et le glycérol. La production a été également menée en milieu complexe *International Streptomyces Project 2* (contenant le glucose comme source de carbone et l'extrait de levure et l'extrait de malt comme sources d'azote). L'activité antimicrobienne a été évaluée par la méthode de diffusion des puits contre *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumonia* et *Fusarium culmorum*. Les meilleures activités ont été obtenues sur le milieu *International Streptomyces Project 2*, et les milieux semi-synthétique et synthétique supplémentés de glucose après 7, 3 et 4 jours d'incubation, respectivement.

Des cultures de la souche TAS18 ont alors été réalisées en milieux semi-synthétique et en milieu synthétique additionnés de glucose. Les antibiotiques produits ont été extraits par différents solvants organiques à partir du filtrat de culture et les meilleurs solvants d'extraction (acétate d'éthyle et dichlorométhane) ont été déterminés par antibiographie. L'analyse par HPLC de ces extraits a montré la présence d'un nombre plus important de composés en milieu semi-synthétique qu'en milieu synthétique.

Mots clés

Actinomadura sp. TAS18, production d'antibiotiques, sources de carbone, sources d'azote, extraction, HPLC.

Abstract

The present work focuses on the study of the effect of some carbon and nitrogen sources on the antibiotics production of an Actinobacteria strain, *Actinomadura* sp. TAS18, isolated from a marine sediment of Tipaza. The aim of this work is to define the culture conditions that allow the best antibiotics production.

The evaluation of the strain TAS18 antagonistic properties by the agar cylinders method showed that this isolate has an interesting (the inhibition diameter varied from 20 to 32 mm) and varied broad spectrum of activity against filamentous fungi, Gram-positive bacteria and Gram-negative.

The search for the best culture conditions for the antibiotics production was carried out with regard to the production kinetics in semi-synthetic culture media containing yeast extract and ammonium sulphate as nitrogen sources and in a synthetic medium that contains ammonium sulphate as the sole source of nitrogen while testing different carbon sources such as glucose, sucrose, starch, dextrin and glycerol. The production was also conducted in *International Streptomyces Project 2* complex medium (containing glucose as carbon source and yeast extract and malt extract as nitrogen sources). The production of antibiotics was evaluated by the well diffusion method against *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumonia* and *Fusarium culmorum*. The best activities were obtained on *International Streptomyces Project 2* medium, and semi-synthetic and synthetic media supplemented with glucose after 7, 3 and 4 days of incubation, respectively.

Cultures of TAS18 strain were then carried out in both semi-synthetic and synthetic media supplemented with glucose. The antibiotics produced were extracted by different organic solvents from the culture filtrate and the best extraction solvents (ethyl acetate and dichloromethane) were determined by antibiography. The HPLC analysis of these extracts exhibited the presence of a larger number of compounds in a semi-synthetic medium than in synthetic medium.

Key words

Actinomadura sp. TAS18, antibiotic production, carbon sources, nitrogen sources, extraction, HPLC

ملخص

يهتم العمل المقدم إلى دراسة تأثير بعض مصادر الكربون و الأزوت على إنتاج المضادات الحيوية من طرف سلالة الأكتينوبكتيريا و المسماة *Actinomadura sp. TAS18* المعزولة من رسوبيات البحرية لمنطقة تيبازة, بهدف عملنا إلى البحث على وسط مغذي ملائم لهذا الإنتاج.

بين تقييم النشاط الضدي للسلالة *TAS18* بطريقة " أفراس الأجار " بأن هذه السلالة تتميز بنشاط ضدي مهم (قطر الضبط يمتد من 20 إلى 32 ملم) و متنوع , و الذي يمس الفطريات الخيطية, البكتيريا موجبة و سالبة الغرام, ما يدل على النشاط الواسع.

تم البحث على وسط ملائم لإنتاج المضادات الحيوية بإتباع دراسة حركية الإنتاج في وسط نصف اصطناعي يحتوي على مستخلص الخميرة و سولفات الأمونيوم كمصدر للأزوت و في وسط اصطناعي يحتوي على سولفات الأمونيوم كمصدر للأزوت مع اختيار مصادر مختلفة للكربون مثل للجلوكوز, السكروز, النشاء, الدكسترين و الغليسرول. كذلك في وسط مركب *ISP2* (يحتوي على الجلوكوز كمصدر للكربون و مستخلص الخميرة و مستخلص الشعير كمصادر للأزوت). قيم إنتاج المضادات الحيوية بطريقة الانتشار باستعمال حفر الأجار ضد *Listeria monocytogenes, Klebsiella pneumonia* و *Fusarium culmorum* ثم الحصول على أفضل النتائج في الوسط *ISP2* و الأوساط نصف الاصطناعية و الاصطناعية . المضاف إليها الجلوكوز بعد 7, 3 و 4 أيام من الحصن على التوالي.

حضرت مزارع من السلالة *TS 18* في الأوساط نصف الاصطناعية في الوسط الاصطناعي المزود بالجلوكوز. تم استخلاص المضادات الحيوية المنتجة بمختلف المذيبات العضوية انطلاقا من رشاحة الوسط . حيث حددت أفضل المذيبات للاستخلاص (*acétate d'éthyle* و *dichlorométhane*) باستعمال طريقة بين التحليل باستعمال ال *HPLC* (الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء) وجود عدد مهم من المركبات في الوسط نصف الاصطناعي منه في الوسط الاصطناعي .

الكلمات المفتاحية

Actinomadura sp. TAS18. إنتاج المضادات الحيوية ، مصادر الكربون ، مصاد الأزوت، استخلاص، *HPLC*.

Introduction

L'arrivée des antibiotiques au début des années quarante, a transformé l'existence de l'humanité. Des maladies fréquentes et souvent mortelles sont devenues « bénignes », et pendant un demi-siècle, cette révolution fut considérée comme définitivement acquise. Cependant, la surconsommation de ces molécules aussi bien en santé humaine qu'animale a inévitablement entraîné l'apparition de souches microbiennes de plus en plus résistantes aux antibiotiques (Livermore, 2009 ; Norrby *et al.*, 2005). Ce phénomène de résistance ne cesse de s'accroître et est devenu une préoccupation essentielle de l'humanité, ce qui justifie un besoin constant en nouvelles molécules antibiotiques. Ces dernières sont obtenues à partir des organismes vivants ou par synthèse chimique.

Les antibiotiques d'origine naturelle présentent des caractéristiques prometteuses. Faiblement toxiques, facilement et rapidement biodégradables, ils permettent le contrôle des maladies infectieuses tout en évitant les problèmes liés à l'utilisation d'antibiotiques de synthèse et des autres produits chimiques, à savoir, leur toxicité, leur faible biodégradabilité et l'accumulation de leurs résidus néfastes (Clardy *et al.*, 2006). La source la plus utilisée pour la recherche de nouvelles molécules bioactives est donc le milieu naturel, notamment les microorganismes (Daniel, 2004; Demain, 2009; Genilloud *et al.*, 2011; Solecka *et al.*; 2012). Les actinobactéries, en particulier celles provenant du sol, sont les plus grands producteurs de ces molécules (Takahashi et Omura, 2003). Les *Streptomyces* produisent plus d'antibiotiques que n'importe quel autre genre bactérien. En conséquence, ils ont été fortement exploités comme source de nouveaux agents antimicrobiens. La probabilité d'isoler de nouvelles molécules antimicrobiennes à partir de ce genre est devenue faible au fil du temps. La recherche s'est donc orientée vers d'autres genres rares tels que *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Streptosporangium* et *Planomonospora* (Jose et Jebakumar, 2013).

Les habitats non explorés et sous-explorés, y compris les écosystèmes marins, sont considérés comme de riches sources d'actinobactéries rares, avec un potentiel énorme pour produire de nouveaux composés intéressants (Hong *et al.*, 2009). En effet, comme les conditions environnementales de la mer sont extrêmement différentes des conditions terrestres, les actinobactéries marines pourraient avoir des caractéristiques différentes des actinobactéries terrestres et pourraient donc produire de nouveaux composés bioactifs et de nouveaux antibiotiques (Subramani et Aalbersberg, 2012).

Il faut cependant se rappeler que les antibiotiques d'origine microbienne sont des produits du métabolisme secondaire. Leur synthèse dépend non seulement du microorganisme producteur mais

aussi de la composition de milieu de culture et des conditions de culture. Ainsi, la recherche des conditions optimales pour la production de ces molécules est donc indispensable.

L'objectif de ce travail est donc la recherche d'un milieu de culture permettant une bonne production des composés antimicrobiens par la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp.

Ce travail est présenté en trois parties:

La première partie est réservée à une analyse bibliographique portant sur les actinobactéries en général et le genre *Actinomadura* en particulier ainsi qu'un état des lieux des connaissances actuelles sur les antibiotiques.

La deuxième partie est relative à la description du matériel et des méthodes utilisés.

Dans la troisième partie, les résultats sont présentés et discutés.

Une conclusion générale et les perspectives qui en découlent ainsi que les références bibliographiques clôturent ce manuscrit.

1. Définition des actinobactéries

Le terme utilisé précédemment pour désigner les actinobactéries est “actinomycètes”. Ce nom est dérivé du grec “aktis” (un rayon) et “mykes” (champignon) et donné à ces organismes à partir de l'observation initiale de leur morphologie. Les actinobactéries étaient à l'origine considérés comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons mais sont reconnus comme des organismes procaryotes depuis la découverte de leur structure dans les années 1950 (Wellington et Ul-Hassan, 2009; Naikpatil et Rathod, 2011). La composition chimique de leur paroi cellulaire est similaire à celle des bactéries gram-positives, mais en raison de leurs caractéristiques morphologiques (hyphes) et culturales bien développées, les actinobactéries ont été considérés comme un groupe bien séparé des autres bactéries courantes (Das *et al.*, 2008)

Les actinobactéries sont classées dans le domaine des *Bacteria*, phylum des *Actinobacteria*. Dans l'édition la plus récente du manuel de Bergey publiée en 2012, ce phylum est défini comme rassemblant les bactéries à Gram positif ayant un taux élevé en guanine + cytosine (supérieur à 55%) et qui forme un groupe homogène sur la base des données moléculaires.

Leur morphologie est très diversifiée allant de coccoïdes (*Micrococcus*) et de bâtonnets coccoïdes (*Arthrobacter*), à des formes mycéliennes fragmentées (*Nocardia*) en mycélium ramifié (par exemple *Streptomyces*) (Barakate *et al.*, 2002). Les actinobactéries mycéliennes produisent un mycélium aérien (de nombreux genres) ou non (par exemple, *Rhodococcus*, *Micromonospora* et autres) et un mycélium du substrat à l'exception du genre *Sporichthya* dont le mycélium aérien est rattaché directement au substrat solide par des cellules "crampons" (Normand et Benson, 2012).

2. Distribution des actinobactéries

Historiquement, les actinobactéries étaient largement considérées comme des bactéries du sol, mais sont maintenant reconnues comme étant cosmopolites. On les trouve dans pratiquement tous les écosystèmes, avec une distribution couvrant la plus grande partie de la planète (Lewin *et al.*, 2016).

2.1. Sol

Bien que les premières souches d'actinobactéries aient été isolées de sources humaines et animales respectivement par Cohn en 1875 et Nocard en 1888, c'est le sol qui en est certainement le réservoir le plus riche, réservoir à partir duquel ces microorganismes peuvent envahir de nombreux biotopes (Zaitlin *et al.*, 2003). Les actinobactéries ont été isolés à partir de divers

types de sols et d'endroits tels que les zones arides, les forêts tropicales, les mines, les grottes, les marécages, les déserts et les savanes (Adegboye et Babalola, 2012). Les actinobactéries les plus dominants dans le sol sont le genre *Streptomyces*, bien que d'autres espèces comme *Norcardia*, *Microbispora*, *Micromonospora*, *Actinomyces*, *Actinoplanes* et *Streptosporangium* aient également été isolées du sol. Le nombre et la variété des actinobactéries présents dans tout échantillon de sol seraient significativement influencés par la localisation géographique, la température du sol, le type de sol, le pH du sol, la teneur en matière organique, les activités agricoles, l'aération, la disponibilité des éléments nutritifs et la végétation du sol (Arifuzzaman *et al.*, 2010).

Dans le sol, les actinobactéries jouent un rôle majeur dans le maintien de l'équilibre microbien et dans le renouvellement de la matière organique par biodégradation et la formation de l'humus, et ce, par le recyclage des nutriments associés aux polymères récalcitrants tels que la kératine, les lignocelluloses et la chitine (Goodfellow et Williams, 1983; George *et al.*, 2012). Elles produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur caractéristique des sols (Zaitlin *et al.*, 2003; Zaitlin et Watson, 2006).

2.2. Milieu marin

Il est prouvé que les actinobactéries forment généralement une petite fraction de la flore bactérienne dans les habitats marins (Chavan *et al.*, 2013).

L'opinion selon laquelle des actinobactéries peupleraient normalement le milieu marin est très controversée. Certains chercheurs considéraient les actinobactéries comme faisant partie d'une microflore marine indigène, tandis que d'autres les considéraient comme des composants lavables qui survivaient simplement dans les sédiments marins et littoraux sous forme de spores. Ce dernier point de vue est corroboré par le fait que le nombre d'actinobactéries dans les habitats marins diminue avec l'éloignement des terres (Goodfellow et Williams, 1983). Plus récemment, des études métagénomiques ont montré que les actinobactéries marines indigènes existent certainement dans les océans (Ward et Bora, 2006). Bull *et al.* (2005) ont constaté que les actinobactéries représentent habituellement jusqu'à 9% des sédiments marins.

Les actinobactéries jouent un rôle important dans l'environnement marin. La dégradation et le renouvellement de divers matériaux sont des processus continus, induits par l'action de divers micro-organismes. Les activités cellulolytiques, protéolytiques, amylolytiques, lipolytiques, chitinolytiques de solubilisation des phosphates des actinobactéries marines ont été rapportées (Sivakumar *et al.*, 2007).

2.3. Faune, flore et Homme

La plupart des actinobactéries sont saprophytes, mais il existe des formes pathogènes capables de provoquer un certain nombre de maladies chez l'Homme et l'animal (Pirouz *et al.*, 1999). Parmi les actinobactéries aérobies pathogènes, le genre *Nocardia* revêt une importance médicale particulière, de même que certains genres apparentés, tels que *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, etc. (Garrity *et al.*, 2004; Van de Sande, 2013). Le mycétome, fréquemment observé en zone tropicale, constitue un cas particulier d'atteinte cutanée et sous-cutanée, et peut être dû à diverses espèces d'actinobactéries (*Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*) ainsi qu'à des champignons. Certaines mycobactéries sont la cause de pathologies humaines, comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la tuberculose) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) ou humaine et animales (*Mycobacterium bovis*, agent de la tuberculose) (Cosivi *et al.*, 2009; Veziris *et al.*, 2013). Enfin, certaines actinobactéries sont des symbiotes de plantes (Larpen et Larpen-Gourgau, 1985). Ainsi, dans la rhizosphère, les actinobactéries appartenant au genre *Frankia* sont importantes pour de nombreux types de plantes. Cette bactérie est capable de fixer l'azote en formant des nodules au niveau des racines de certaines angiospermes, ce qui confère donc un avantage à la plante pour croître dans un sol pauvre en azote. Cette relation « plante actinobactérie » est appelée association actinorhizienne (Prescott *et al.*, 2007). Plusieurs plantes abritent des actinobactéries qui promeuvent leur croissance et les protègent contre plusieurs pathogènes (Qui *et al.*, 2009; Li *et al.*, 2012). Peu d'espèces sont phytopathogènes, l'exemple le plus étudié étant *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (Lindholm, 1997).

3. Données sur le genre *Actinomadura*

3.1. Caractéristiques du genre *Actinomadura*

L'histoire du genre *Actinomadura* commença quand Vincent (1894) a pu isoler l'agent causal du pied de Madura (Manuel de Bergey, 2012). Le nom proposé était alors *Streptothrix madurae*. Cependant, cet isolat a été transféré au genre *Nocardia* puis au genre *Streptomyces*. Après l'application de la chimiotaxonomie, Lechevalier et Lechevalier (1970) ont proposé la création d'un nouveau genre "*Actinomadura*" avec *Actinomadura madurae* comme espèce type.

L'édition de 2012 du Manuel de Bergey présente la classification du genre comme étant un membre de la classe des *Actinobacteria* faisant partie de l'ordre des *Streptosporangiales* et de la famille des *Thermomonosporaceae*. Actuellement ce genre comprend 85 espèces et 2 sous-espèces décrites et validées (Euzéby, 2018).

Les membres de ce genre sont des actinobactéries aérobies, à Gram positifs, non-acido-alcoolorésistants, non mobiles qui forment des mycéliums substrats non fragmentés et largement ramifiés, tandis que leurs mycéliums aériens sont modérément développés ou absents. Cependant, lorsqu'ils sont présents, les mycéliums aériens à maturité forment des chaînes de spores courtes ou parfois longues, et elles peuvent être droites, incurvées ou spiralées (figure 1). Les spores sont ovales ou à tige courte avec des surfaces plissées, irrégulières, rugueuses, lisses, épineuses ou verruqueuses (Tseng *et al.*, 2009 ; Jiao *et al.*, 2015).

Le genre *Actinomadura* est parfois considéré comme faisant partie des actinobactéries dites “rares” car il est présent en faible quantité, mais dans plusieurs écosystèmes (Lazzarini *et al.*, 2000).

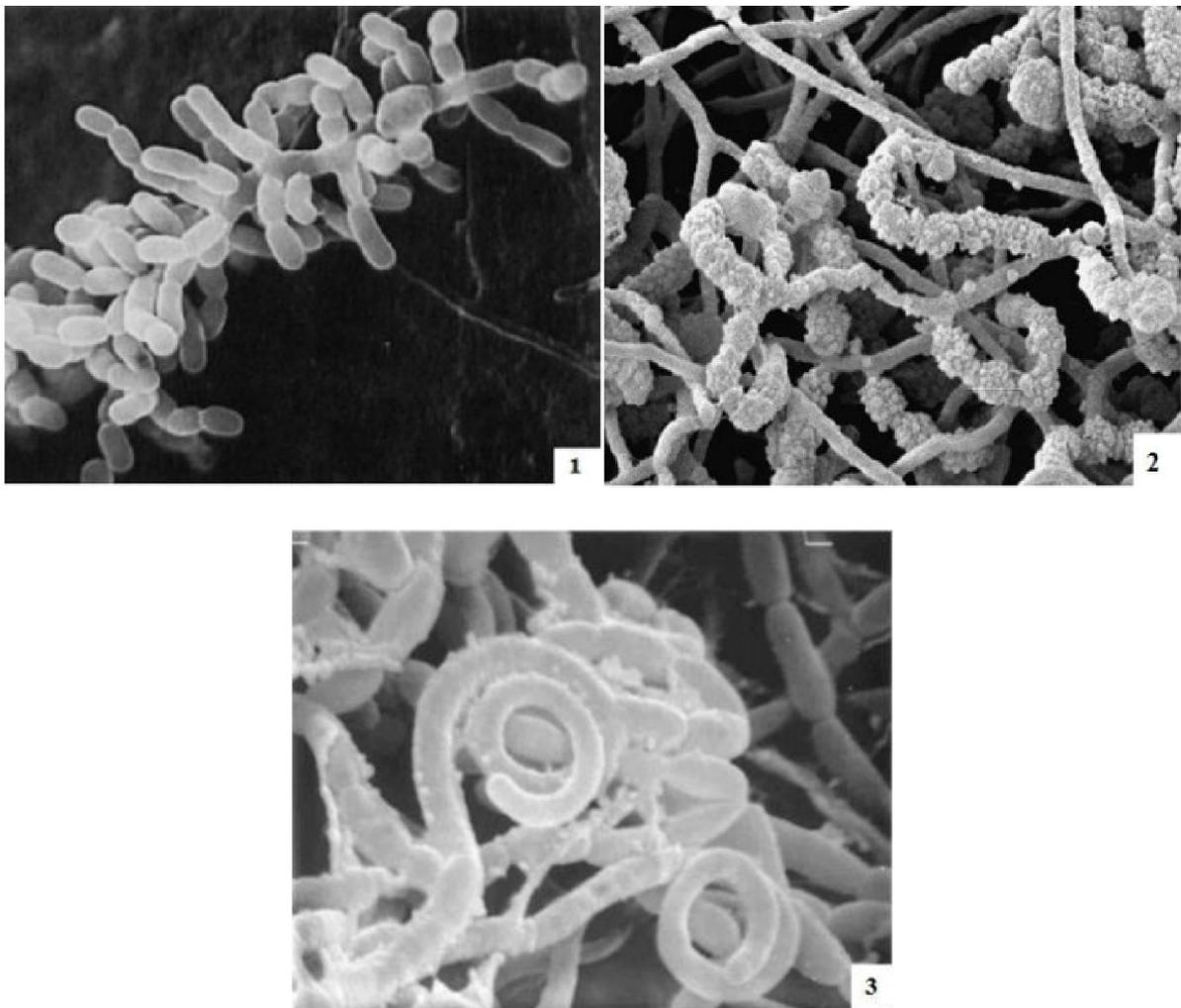


Figure 1. Micromorphologie de trois espèces d'*Actinomadura*.

1: chaînes de spores droites d'*Actinomadura atramentaria* (Miyadoh *et al.*, 1987); 2: chaînes de spores bouclées d'*Actinomadura mexicana* (Quintana *et al.*, 2003); 3: chaînes de spores spiralées d'*Actinomadura namibiensis* (Wink *et al.*, 2003).

3.2. Distribution du genre *Actinomadura*

Les espèces de ce genre sont isolées de sols désertiques, cultivables et de montagnes, le sol représente leur principal réservoir (Wink *et al.*, 2003 ; Lee., 2012 ; Lahoum *et al.*, 2016). Il a été aussi isolé de la surface d'une pierre (Lee et Lee, 2010), de sédiments marins (He *et al.*, 2012), de composts (Puhl *et al.*, 2009), de feuilles de plantes (Qin *et al.*, 2009), de ruche de miel d'abeilles (Promnuan *et al.*, 2011). D'autres ont été obtenues à partir de spécimens cliniques, comme c'est le cas d'*A. madurae*, *A. latina* et *A. pelletieri* qui sont pathogènes pour l'Homme (Ispogloua *et al.*, 2003).

4. Antibiotiques

4.1. Définition des antibiotiques

Etymologiquement, le terme “antibiotique” est dérivé des mots grecs “anti” qui veut dire contre et “bios” qui signifient la vie, c'est-à-dire, “contre la vie”. Un antibiotique est une substance qui peut être naturelle, synthétique ou semi-synthétique inhibant ou tuant les germes pathogènes à faible concentration. En plus de leurs activités antimicrobiennes, les molécules bioactives sont parfois douées d'autres activités biologiques telles que les activités antitumorales, hypocholestérolémiques, inhibitrices d'enzymes, ou encore antiparasitaires, insecticides et herbicides, etc. (Demain, 1999; Barka *et al.*, 2016; Mohammadipanah et Wink, 2016).

4.2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques constituent un groupe hétérogène de molécules biologiquement actives. Ils peuvent être classés selon plusieurs critères: la structure chimique, l'origine, le mécanisme d'action et le spectre d'action (Berdy *et al.*, 1987; Bycroft, 1988; Yala *et al.*, 2001). La classification la plus utilisée en recherche est celle basée sur le regroupement de ces molécules en grandes classes selon leur structure chimique (tableau 1).

4.3. Spectre d'action des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être actifs contre les bactéries à Gram positif et/ou les bactéries à Gram négatif et/ou les champignons. Ainsi, on définit trois types d'action des antibiotiques à (Yala *et al.*, 2001; Stora, 2013):

- Antibiotiques à spectre large: il s'agit des antibiotiques efficaces sur un grand nombre de types de germes (aminosides, chloramphénicol).

Tableau 1. Principaux antibiotiques et leur classification (Joffin et Leyral, 2014)

Classes d'antibiotique	Exemples			
Aminosides	Streptomycine, Kanamycine, gentamicine, tobramycine, amikacine			
Antituberculeux	Ethambutol, Isoniazide			
Antifongiques	Amphotéricine B (= fungizone), nystatine, flurocytosine, kétoconazole			
β-lactamines	Noyau de type	Classe	Exemples	
	Pénicilline	Pénams	Penicilline G, Aminopénicillines (pénicillines A): ampicilline, amoxicilline... Carboxypénicillines (ou acyluréidopénicillines): piperacilline... Amidinopénicillines: mécilinam Isoxazolypénicillines (pénicillines M): oxacilline	
			Carbapénèmes	Imipénème, ertapénème, doripénème, méro-pénème
			Oxapénèmes	(= Clavams): acide clavulanique
	Céphalosporine	1 ^{er} génération (C1G)	Céfadroxil, céfalexine, céfazoline, céfalotine	
		2 ^e génération (C2G)	Céfaclor, céfuroxime, céfotétan, céfoxitime...	
		3 ^e génération (C3G)	Céfixime, céfotaxime, cefpodoxime, ceftazidime, certibuten, ceftriaxone, céfopérazone...	
		4 ^e génération (C4G)	Céfépime, cefpirome,...	
		5 ^e génération (C5G)	Ceftaroline...	
	β-lactame seul	Monobactames	Aztréonam	
Fosfomycines	Fosfomycine			
Glycopeptides	Vancomycine, teicoplanine			
Imidazolés (5-nitro-)	Métronidazole			
Macrolides et apparentés	Macrolides vrais	Erythromycine, spiramycine, josamycine		
	Lincosamides	Clindamycine, lincomycine		
	Streptogramines	Pristinamycine, virginiamycine		
	Kétolides	Télithromycine		
Nitrofuranes	Nitrofurantoïne			
Phénicolés	Chloramphénicol			
Polypeptides	Colistine, bacitracine, polyxine			
Quinolones	1 ^{er} génération: acide nalidixique 2 ^e génération (fluoroquinolones): norfloxacin, ciprofloxacine...			
Sulfamides et diamino-2-4-pyrimidines (Sulfones)	Sulfaméthoxazole Triméthoprime (le cotrimoxazole est l'association de ces deux molécules)			
Tétracyclines	Tétracycline, minocycline, tigécycline			
Oxazolidinones	Linézolide			
Lipopeptides	Daptomycine			

- Antibiotiques à spectre moyen ou limité: il s'agit des antibiotiques dont l'efficacité est réduite ou partielle sur un groupe de germe (pénicilline).
- Antibiotiques à spectre étroit: il s'agit des antibiotiques efficaces sur un nombre limité de types de germes (vancomycine, polymexine).

4.4. Modes d'action des antibiotiques

Le mode d'action des antibiotiques est diversifié. Ils agissent par inhibition des réactions de synthèse variées en se fixant sur des sites précis ou cibles moléculaires. Ces derniers doivent être absentes dans les cellules de mammifères ou, si elles sont présentes, doivent différer suffisamment pour permettre une inhibition sélective des cibles bactériennes ou fongiques (Lambert, 2005).

4.4.1. Modes d'action des antibiotiques antibactériens

Les antibiotiques perturbent des processus biochimiques importants, ce qui entraîne l'inhibition de la croissance et de la division cellulaire et, dans le cas des agents bactéricides, la mort cellulaire (Brown et Wrigh, 2016). Ils sont regroupés en quatre catégories selon leur site d'activité. Ce site peut être la paroi cellulaire, la membrane cellulaire, les protéines ou les acides nucléiques (figure 2).

Les antibiotiques ayant une action sur la paroi bactérienne agissent par inhibition de la synthèse de peptidoglycane. Ils sont généralement les β -lactamines (y compris les pénicillines, les carbapénèmes et les céphalosporines), les glycopeptides (la vancomycine et la téicoplanine), la fosfomycine et la bacitracine (Kohanski *et al.*, 2010).

Les antibiotiques antibactériens agissent également au niveau des membranes cellulaires, externes et cytoplasmiques (les polymexines) en altérant la structure membranaire conduisant à la formation de pores laissant échapper le contenu cellulaire (Prescott, 2002 ; Yoneyama et Katsumata, 2006).

Les inhibiteurs de la synthèse protéique représentent un groupe important et varié d'antibiotiques, notamment les aminoglycosides, les tétracyclines, le chloramphénicol, les macrolides, l'acide fusidique et la mupirocine. Ils agissent au niveau des différentes étapes de la traduction (l'initiation, l'élongation et la terminaison) (Kohanski *et al.*, 2010; Allison et Lambert, 2015).

D'autres antibiotiques inhibent le métabolisme des acides nucléiques tels que les inhibiteurs de l'ARN polymérase (rifampicine) qui inhibe la transcription de l'ADN en ARN messager, les

inhibiteurs de la réplication de l'ADN (quinolones) qui se fixent sur les brins d'ADN et les inhibiteurs de l'acide folique nécessaire à la synthèse des acides nucléiques (sulfamides et triméthoprime) (Yoneyama et Katsumata, 2006; Kohanski *et al.*, 2010;).

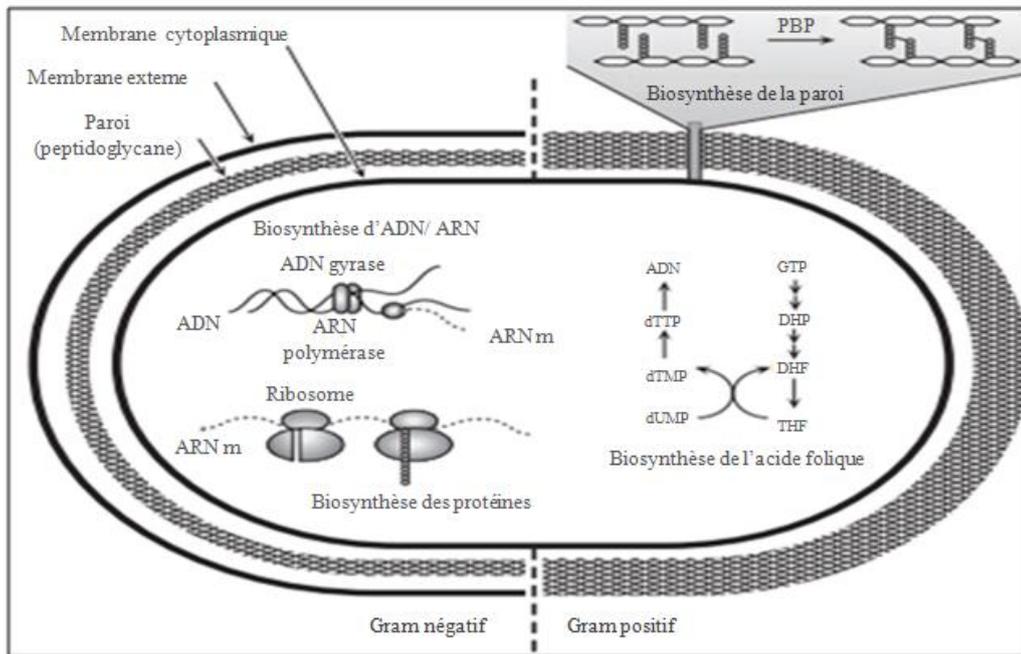


Figure 2. Cibles majeurs des antibiotiques antibactériens (Yoneyama et Katsumata, 2006)

4.4.1. Modes d'action des antibiotiques antifongiques

Les substances antifongiques affectent le cycle de vie normal des champignons en causant des interférences métaboliques au niveau cellulaire, selon divers mécanismes: inhibition de la synthèse des glucanes et de la chitine, composants de la paroi cellulaire (ex: échinocandines et polyoxines respectivement), inhibition de la synthèse de l'ergostérol nécessaire à la formation de la membrane cellulaire (ex: dérivés azolés), inhibition de la synthèse des protéines (ex: sordarines), inhibition de la synthèse des acides nucléiques (ex: Flucytosine) et l'inhibition de la division cellulaire (exemple, griséofulvine) (Kathiravan *et al.*, 2012).

5. Rôle des actinobactéries dans la production des antibiotiques

Les actinobactéries ont une grande importance dans le domaine de la biotechnologie, en tant que producteurs d'une pléthore de métabolites secondaires bioactifs ayant de vastes applications industrielles, médicales et agricole (Barka *et al.*, 2016). De nombreux antibiotiques naturels ont été découverts à partir de ce groupe depuis la découverte de la streptomycine par Selman Waksman en 1994 et plusieurs études indiquent leur production remarquable d'antibiotiques (Velayudham et Murugan, 2012).

Les antibiotiques d'origine actinobactérienne présentent une grande variété de structure chimique, y compris les aminoglycosides, antracyclines, β -lactamines, nucléosides, peptides, polyènes, actinomycines et tétracyclines (Barrios-Gonzalez *et al.*, 2005). Selon Baltz (2007), certaines molécules se retrouvent à des fréquences beaucoup plus élevées que beaucoup d'autres antibiotiques. Par exemple, la streptothricine est retrouvée dans environ 10% des streptomycètes isolées au hasard dans le sol et la streptomycine dans 1% et l'actinomycine dans 0,1%, alors que l'érythromycine et la vancomycine se retrouvent dans environ 10 isolats du sol et la daptomycine seulement à une fréquence d'environ 10^{-7} . Ainsi, La capacité de production des actinobactéries individuels peut également varier énormément. Certaines espèces de streptomycètes produisent un seul antibiotique, tandis que d'autres produisent une gamme de différents composés et classes de composés (Barka *et al.*, 2016).

Au sein de ce groupe, Le genre *Streptomyces* est une source importante de métabolites secondaires, en particulier d'antibiotiques. Les espèces de *Streptomyces* sont connues pour produire plus de 50% du total des antibiotiques microbiens connus ($\geq 10\ 000$) (Shivlata and Satyanarayana, 2015). Les autres genres (dont certains sont relativement rares) tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nocardiopsis*, etc., sécrètent aussi de nombreux antibiotiques (plus de 2500) dont plusieurs sont importants sur le plan thérapeutique (Sarkar *et al.*, 2008; Genilloud *et al.*, 2010).

Ces dix dernières années, le taux de découverte de nouveaux antibiotiques chez le genre *Streptomyces* a baissé (Solanki *et al.*, 2008). Les chercheurs ont donc commencé à s'intéresser à d'autres genres, appelés parfois actinobactéries rares, et ce, dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2009). Les actinobactéries rares constituent l'une des sources les plus prometteuses pour découvrir de nouveaux métabolites bioactifs. L'intérêt que suscitent ces bactéries dans ce domaine est surtout lié au fait que de nombreux antibiotiques intéressants ont été isolés de genres rares ou peu fréquents (Genilloud *et al.*, 2011).

6. Antibiotiques produits par certaines espèces d'*Actinomadura*

Le genre *Actinomadura* est considéré comme un genre rare connu pour la production d'environ 350 antibiotiques appartenant à différentes familles (quinolones, antracyclines et polypeptides) (Tiwari et Gupta, 2012 ; Bhattacharjee *et al.*, 2017).

Tableau 2. Liste de quelques antibiotiques produits par certaines espèces du genre *Actinomadura* (In Tiwari et Gupta, 2012)

Espèce	Antibiotique	Classe d'antibiotique
<i>A. carminata</i>	Carminomycine	Anthracycline
<i>A. hibisica</i>	Pradimicine D, E	Anthracyclines
<i>A. kijaniata</i>	Rubeomycine B, B1 Kijanimicine	Aminoglycosides
<i>A. madurae</i>	Carbazomadurines A, B	Carbazoles
<i>A. madurae</i>	Maduropeptines	Peptides
<i>A. madurae</i>	Simaomicine	Isoquinolines
<i>A. pusilla</i>	Actinotiocine	Peptide
<i>A. roseoviolacea</i>	Akrobomycine	Anthracyclines
<i>A. spinosa</i>	Pradimicines FS, FB	Anthracyclines
<i>A. spiralis</i>	Pyralomicines	Benzopyranes
<i>A. verrucosospora</i>	Esperamicine	Aminoglycosides
<i>A. verrucosospora</i>	Pradinone I	Anthracyclines

7. Résistance aux antibiotiques

Pour être efficace, un antibiotique doit parvenir à se fixer sur sa cible et perturber ainsi les fonctions vitales du microorganisme. Ceci doit se dérouler sans que l'antibiotique ne soit détruit ou modifié. Si l'antibiotique ne parvient pas à se fixer sur sa cible, il devient inefficace. Ce phénomène est appelé résistance.

La résistance aux antibiotiques est un phénomène universel, elle est favorisée par la pression de la sélection antibiotique. Elle peut être naturelle ou acquise. Cette dernière peut être obtenue soit par mutation chromosomique (peu fréquente: 20%), ou par transfert de plasmides conjugatifs ou de transposons (mécanismes les plus fréquents: 80%) (Yala *et al.*, 2001 ; Barrial *et al.*, 2005).

Les mécanismes de résistance aux antibiotiques peuvent être enzymatiques (production des enzymes inactivant l'antibiotiques) ou non enzymatiques (réduction de la perméabilité cellulaire à l'antibiotique, rejet de l'antibiotique hors de la cellule par des systèmes d'efflux, modification de la cible d'antibiotique) (Cavallo *et al.*, 2004).

8. Recherche de nouvelles molécules antibiotiques

Le développement de la résistance aux antibiotiques, l'émergence d'espèces microbiennes considérées jusqu'ici comme non pathogènes pour l'Homme et le nombre réduit d'antifongiques utilisables en thérapeutique, ainsi que la toxicité de certains d'entre eux, ont obligé les laboratoires de recherche et les industries pharmaceutiques à continuer leurs efforts afin de découvrir de nouvelles molécules plus efficaces et moins toxiques (Bauda et Monfort, 2004; Accoceberry et Noël, 2007; Jose et Jebakumar, 2013).

Les antibiotiques sont élaborés par divers organismes vivants. Ils peuvent également être produits par synthèse chimique totale ou par hémisynthèse (Delaunay *et al.*, 2003; Solecka *et al.*, 2012). Dans ce cas, de nouvelles molécules sont synthétisées chimiquement, ou des molécules existantes sont modifiées. Au début des années 2000, la plupart des antibiotiques utilisés sont des dérivés semi-synthétiques. Ces antibiotiques dits de deuxième ou de troisième génération sont produits à partir des antibiotiques naturels, par modifications chimiques qui tiennent compte des études de la relation structure-activité. L'objectif est d'améliorer la posologie, d'étendre le spectre d'activité, de lutter contre les résistances acquises des micro-organismes cibles à éradiquer (Delaunay *et al.*, 2003).

La complexité des molécules antibiotiques est telle que les méthodes purement chimiques ne sont pas économiquement rentables. La voie biologique reste la voie principale de synthèse de la plupart des antibiotiques et le milieu naturel demeure donc la source la plus probable pour découvrir de nouveaux antibiotiques (Solecka *et al.*, 2012 ; Tiwari et Gupta, 2012).

Les antibiotiques sont recherchés chez divers organismes vivants, notamment les microorganismes (champignons et bactéries), les plantes (nombreuses espèces) et les animaux (les éponges marines) (Abbas *et al.*, 2010). Parmi les microorganismes, les actinobactéries constituent l'un des groupes les plus étudiés pour le dépistage de nouvelles molécules bioactives (Solecka *et al.*, 2012).

9. Influence des conditions de culture sur la production des antibiotiques par les actinobactéries

La production des antibiotiques (métabolites secondaires) chez les actinobactéries dépend de l'activité enzymatique relative à la voie métabolique concernée et de la quantité de précurseurs disponibles. Ces deux paramètres sont sous l'influence de plusieurs facteurs nutritionnels (sources de carbone et d'azote, de phosphate inorganique, d'oligoéléments, etc.) et physico-chimiques et environnementaux (pH, température, aération et vitesse d'agitation). Il ne s'agit pas seulement de sélectionner une souche hautement productrice, mais il est également nécessaire de définir les conditions de culture optimales (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

9.1. Facteurs nutritionnels

Le milieu de culture approprié doit contenir quantitativement et qualitativement les aliments exigés pour favoriser la croissance de la souche et assurer une production maximale de l'antibiotique. Parfois, le milieu de production n'est pas nécessairement identique à celui permettant une bonne croissance des souches (Larpent et Sanglier, 1989). La biosynthèse des antibiotiques est souvent contrôlée par des mécanismes dus au métabolisme des sources de carbone, d'azote et de phosphate (Martin et Demain, 1980; Shimizu, 2013). Les sels minéraux ont également un rôle de régulation non négligeable (activation ou inhibition des enzymes de synthèse des antibiotiques).

Le carbone est un élément structural des cellules microbiennes et aussi une source d'énergie. La disponibilité et le type de la source carbonée utilisée influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques (Spizek et Tichy, 1995). La production spécifique de métabolites secondaires s'avère souvent meilleure avec une source de carbone complexe, plus difficilement métabolisable comme les polysaccharides (amidon, dextrines) (Lebrihi *et al.*, 1988; Lounès *et al.*, 1995), les oligosaccharides (fructose, galactose, lactose) (Basak et Majumdar, 1973) ou les huiles (méthyloléate, huile de soja) (Cortès *et al.*, 1986; Park *et al.*, 1994), que sur une source de carbone rapidement assimilable telle que le glucose ou le glycérol et même le citrate. En revanche, le glucose peut s'avérer être la meilleure source de carbone pour la production d'antibiotiques. C'est le cas des dithiopyrrolones produites par *Saccharothrix algeriensis* (Lamari, 2006).

L'azote est indispensable pour la biosynthèse des acides aminés, des bases azotés, ainsi que d'un grand nombre de biomolécules essentielles. Beaucoup d'antibiotiques comptent au moins un atome d'azote dans leur structure. La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures

productrices d'antibiotiques influe et contrôle fortement le taux de croissance et les rendements de production (Lebrihi *et al.*, 1992). L'azote est apporté sous forme minérale (ions ammonium, nitrates ou nitrites) ou organique (acides aminés, peptides ou protéines). Les sources inorganiques d'azote comme les sels d'ammonium supportent une bonne croissance bactérienne mais entraînent une faible production en métabolites secondaires. Dans le cas de nombreux métabolites la production est meilleure lorsque la source d'azote est organique (Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992; Spizek et Tichy, 1995).

9.2. Inoculum

L'inoculum se définit comme l'ensemble de la biomasse (spores, cellules, hyphes) nécessaire pour ensemercer un milieu de culture de production (Delaunay *et al.*, 2003). L'importance (quantité) et l'âge de l'inoculum sont généralement les deux seuls paramètres considérés (Brown et Zainudeen, 1978). Des travaux portant sur la mise au point d'un milieu de production synthétique afin d'effectuer des études physiologiques ont montré la nécessité de standardiser la pré-culture afin de faire face à des problèmes de reproductibilité (Paquet, 1990). Les caractéristiques morphologiques pour les actinobactéries sont également à prendre en compte (Whitaker et Long, 1973). En étudiant la production de la pénicilline et la griséofulvine, Smith et Calam (1980) ont montré que les pelotes de mycélium denses conduisaient à de plus faibles diffusions de substrats que les pelotes ouvertes.

9.3. Facteurs physico-chimiques

L'influence des facteurs physico-chimiques (pH, température, agitation et aération) sur l'initiation de la biosynthèse des métabolites secondaires et l'amélioration des rendements n'est pas à négliger.

Le pH joue un rôle primordial dans la production des antibiotiques. De faibles variations de pH peuvent avoir des effets marqués sur la productivité d'une souche. D'une manière générale, la production est optimale à pH légèrement basique (Larpent et Sanglier, 1989; Larpent-Gourgaud et Sanglier, 1992).

La température est un facteur physicochimique qui influence profondément la croissance et la productivité d'une souche selon qu'il s'agit d'une souche mésophile, thermophile ou psychrophile (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997). Les températures optimales permettant une synthèse des antibiotiques sont généralement plus basses que celles permettant la croissance (Larpent et Sanglier, 1989).

L'agitation agit sur la morphologie de la souche, sur la croissance et sur la production d'antibiotiques. En effet, l'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. L'augmentation de la vitesse d'agitation provoque un accroissement des forces de cisaillement auxquelles vont être soumis les microorganismes filamenteux. Ces forces vont provoquer une fragmentation du mycélium et mènent souvent à l'apparition de structures plus compactes (Ohta *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1997). La vitesse d'agitation utilisées lors des productions d'antibiotiques ne sont pas nécessairement les mêmes pour toutes les actinobactéries (Smaoui, 2010).

I. Matériel

1. Souche d'actinobactérie

La souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. étudiée dans notre travail provient du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba-Alger. Elle a été isolée par Meklat *et al.* (Travaux en cours) à partir d'un échantillon de sédiment marin prélevé de la région de Tipaza, sur le milieu « chitine-vitamines B-agar » (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné d'actidione (50 µg/mL) et d'acide nalidixique (10mg/l). La souche TAS18 est conservée à 4°C, sur le milieu ISP2 (*International Streptomyces Project 2*) incliné ou liquide (en tubes à vis). Ce milieu est adéquat pour la croissance et la sporulation des actinobactéries.

Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S a confirmé l'appartenance de la souche TAS18 au genre *Actinomadura*. En effet, l'espèce la plus proche est *A. bibisca* avec une similitude de l'ordre de 98,89 %.

2. Souches de microorganismes-cibles

Les germes-cibles utilisés proviennent de la collection du LBSM et sont des représentants de différents types de microorganismes (bactéries à Gram positif, bactéries à Gram négatif, champignons filamenteux). La majorité de ces microorganismes sont pathogènes ou toxigènes pour l'Homme, ou encore phytopathogènes. Ils sont conservés à 4°C par repiquage sur les milieux MH (bactéries et levures) et PDA (champignons filamenteux) (voir composition en annexe). Le tableau 3 représente l'ensemble des germes cibles utilisés.

Tableau 3. Liste de microorganismes-cibles testés

	Souches cibles
Bactéries à Gram positif	<i>S. aureus</i> 639c; <i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932.
Bactéries à Gram négatif	<i>Klebsiella pneumonia</i> , <i>Salmonella arizonae</i> , <i>Escherichia coli</i>
Champignons filamenteux	<i>Fusarium culmorum</i> , <i>Aspergillus carbonarius</i> M333, <i>Aspergillus ochraceus</i>

II. Méthodes

1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. sur milieu solide

La mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche TAS18 est effectuée par la méthode des cylindres d'agar (Patel et Brown, 1969) vis à vis les microorganismes-cibles listés dans le tableau 3.

L'actinobactérie est ensemencée en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2 solide (annexe). Après 10 jours d'incubation à 30°C, des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre sont découpés à l'aide d'un emporte pièce et déposés à la surface d'un milieu semi-solide (12 g/l d'agar) préalablement ensemencé par un germe cible (Le milieu MH pour les bactéries et le milieu PDA pour les champignons filamenteux). Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2 h, pour permettre une bonne diffusion de l'antimicrobien toute en arrêtant momentanément la croissance des microorganismes-cibles, puis incubées à 30°C pendant 24 h pour les bactéries et 48 h pour les champignons filamenteux. La lecture des résultats est réalisée par la mesure des zones d'inhibition (zone claire) autour des cylindres d'actinobactérie (Figure 3).

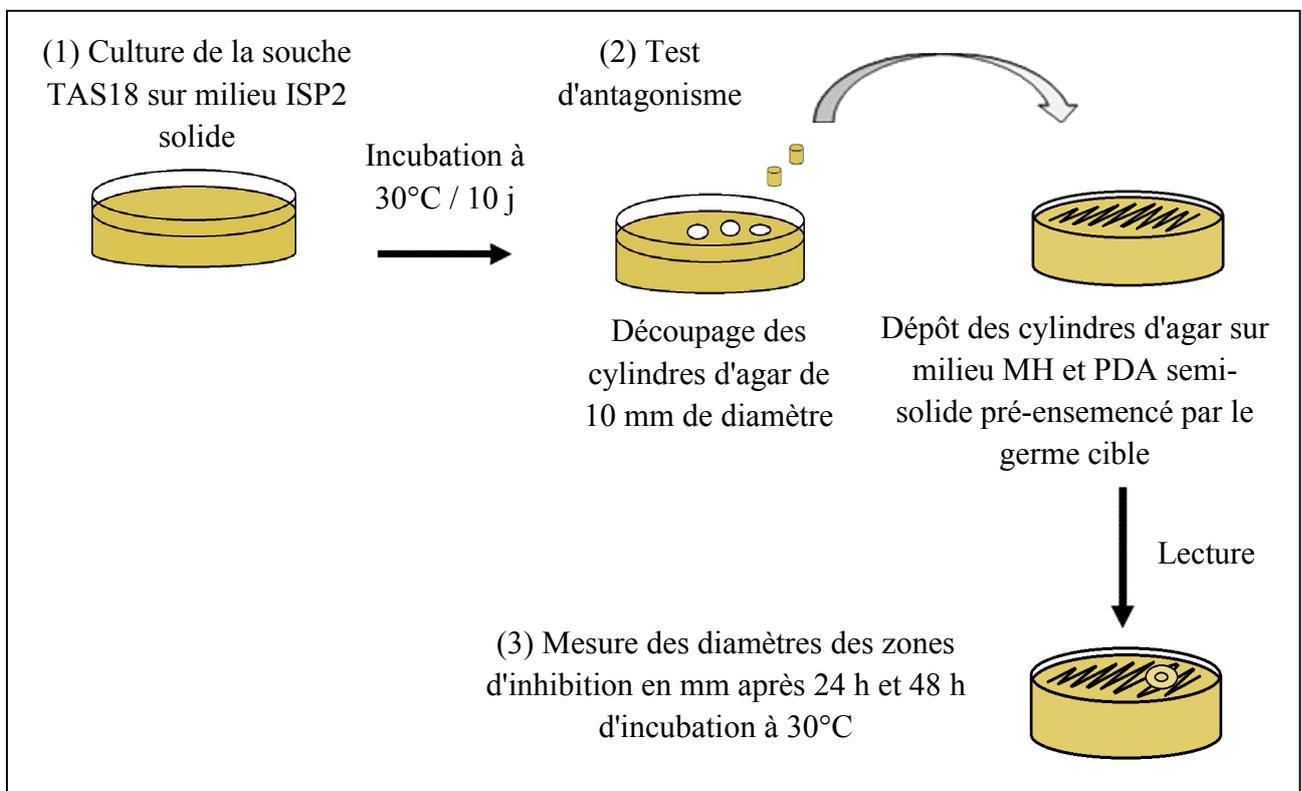


Figure 3. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne de la souche TAS18 par la méthode des cylindres d'agar.

2. Cinétiques de production des antimicrobiens de la souche TAS18 en milieux liquides

Les cinétiques de production des antimicrobiens ont été réalisées en vue de déterminer un milieu de culture permettant une production maximale des antibiotiques en un temps de production optimale. Un protocole de cinétique est schématisé dans la figure 4. A partir d'un inoculum de la souche, des pré-cultures sont ensemencées. Celles-ci serviront à inoculer les milieux de production. Les cinétiques seront suivies pendant 8 jours (à l'exception de milieu synthétique additionné de dextrine lequel la cinétique a été prolongée aux 12 jours), où des prélèvements seront effectués toutes les 24 h pour évaluer la croissance et la production de l'activité antimicrobienne. Il faut noter que les cinétiques sont conduites dans les mêmes conditions à savoir, les volumes de l'inoculum, de pré-cultures et de cultures, les conditions de prélèvements et de mesures.

2.1. Milieux de culture

Afin d'étudier l'effet de quelques sources de carbone et d'azote sur la production des antimicrobiens par la souche TAS18, deux milieux de culture (liquides) ont été utilisés. Il s'agit de :

- Milieu synthétique (MS) qui contient le sulfate d'ammonium comme une source d'azote inorganique.
- Milieu semi-synthétique (MSS) renfermant comme sources d'azote le sulfate d'ammonium et l'extrait de levure (source organique).

Pour les sources de carbone, des représentants de mono (glucose), di (saccharose) et polysaccharides (amidon, dextrine) ainsi que des dérivés glucidiques (glycérol) ont été testés. Ces glucides sont ajoutés chacun à raison de 1% (10g/L) aux milieux de culture.

Un milieu de culture complexe ISP2 est également utilisé. La composition de ces milieux est donnée en annexe.

2.2. Préparation des pré-cultures

Les pré-cultures sont préparées dans des fioles d'Erlenmeyer de 250 ml contenant chacune 50 ml de milieu de culture (milieu ISP2, milieux MS et MSS additionnés de différentes sources de carbone). Chaque fiole reçoit un inoculum de 2 carottes de 4 mm de diamètre prélevées à l'aide d'un emporte pièce stérile à partir des cultures de la souche TAS18 âgées de 10 jours et poussant sur milieu ISP2 solide (Wang *et al.*, 2010). Ces Erlenmeyer sont ensuite incubés à 30°C dans un

shaker en agitation permanente (250 rpm) pendant 4 jours. Après incubation, les pré-cultures sont utilisées pour inoculer les milieux de production (cultures).

L'objectif de cette étape est l'adaptation de la souche d'actinobactérie aux conditions du milieu. Cette étape permet également de réduire le temps de la phase de latence et offrir des cellules en pleines phase de croissance; ce qui permet un bon démarrage de la production.

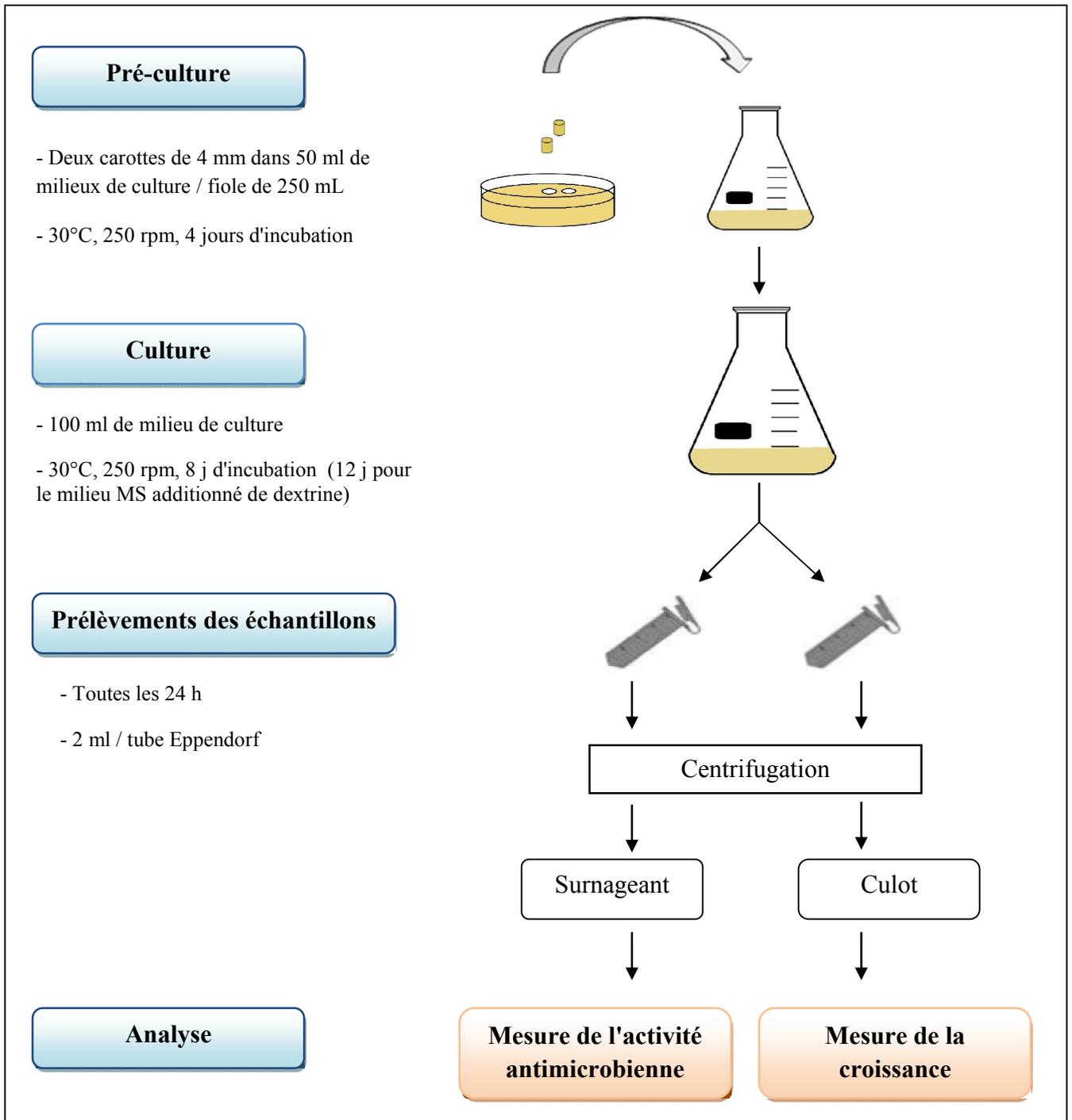


Figure 4. Schéma du protocole des cinétiques de production des antibiotiques.

2.3. Préparation des cultures

Pour les cinétiques de production, des fioles d'Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu de culture (milieu ISP2, milieux MS et MSS additionnés de différentes sources de carbone). sont utilisées. Chaque Erlenmeyer estensemencé par un inoculum de 3 ml de la pré-culture correspondante puis incubée aux mêmes conditions de température et d'agitation que les prés-cultures pendant une période de 8 jours (12 jours pour le milieu MS additionné de dextrine). Des prélèvements sont effectués aseptiquement à des intervalles de temps de 24 h pour réaliser les mesures de la croissance et de l'activité antimicrobienne.

2.4. Mesure de la croissance

La croissance cellulaire est estimée par la mesure du poids sec de la biomasse contenue dans un volume de culture connu. Cette mesure est effectuée selon la méthode de Pfefferle *et al.* (2000) avec quelques modifications. Pour chaque échantillon, 2 ml de culture est prélevé et mis dans un tube Eppendorf préalablement séché (24 h à 105°C) et taré. Le tube est ensuite centrifugé à 12000 rpm pendant 10 min. Le culot est lavé par centrifugation à avec une solution d'HCl (0,35 N) qui dissout le CaCO₃ résiduel puis avec l'eau distillée. Par la suite, le tube est placé dans une étuve à 105°C durant 24 h, puis pesé (après refroidissement) pour déterminer le poids de la matière sèche après soustraction du poids de la tare. Le poids sec ainsi déterminé est ensuite rapporté au litre de volume de fermentation (exprimé en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture). Les pesées sont effectuées sur une balance de précision (KERN ABJ).

2.5. Mesure de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est déterminée par la méthode de diffusion des puits (Aszalos, 1986) contre les germes-cibles les plus sensibles selon les résultats de l'antagonisme. Cette méthode consiste à ensemencer le germe cible dans un milieu semi-solide (12 g/l d'agar) maintenu en surfusion à 45°C (le milieu MH pour les bactéries et le milieu PDA pour les champignons filamenteux). Les milieux inoculés sont ensuite coulés en boîte de Pétri de manière à obtenir 4 ml de milieu par boîte (soit 20 ml/boîte de 90 mm de diamètre). Après solidification à une température ambiante, des puits (5 puits par boîte) sont confectionnés à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre.

Un échantillon de 2 ml de surnageant de culture est prélevé stérilement dans des tubes Eppendorf stériles. Une aliquote de 100 µL est introduite dans chaque puits. Les boîtes sont mises 2 h à

4°C, puis incubées pendant 24 h à 48 h à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits.

3. Extraction des antimicrobiens

Après sélection du meilleur milieu de culture pour la production des antibiotiques et détermination du jour de production optimale, on refait des cultures de production dans le milieu choisi. Les cultures sont arrêtées au jour de production optimale (déterminé lors des cinétiques). Les antibiotiques sécrétés par la souche TAS18 sont donc extraits à partir du filtrat de culture. La figure 5 illustre les différentes étapes suivies pour l'extraction.

3.1. Extraction à partir du filtrat de culture

L'extraction à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible avec l'eau correspondant au mieux à la polarité des antibiotiques à extraire. Pour cela, quatre solvants de polarité croissante sont testés (index de polarité): le n-hexane (00), le dichlorométhane (3,1), le n-butanol (4) et l'acétate d'éthyle (4,4).

Les cultures sont filtrées sur papier Wathman n°1 afin d'éliminer la masse mycélienne qui ne contient pas (ou très peu) de substances antimicrobiennes. Les filtrats obtenus sont répartis en 4 fractions de 200 ml et chacun est extrait avec le même volume de solvant dans une ampoule à décanter (extraction liquide-liquide). Les phases organiques, séparée de la phase aqueuse, sont récupérées puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (Whatman n°1) contenant 2 g du sulfate de sodium anhydre (entonnoir + papier filtre + 2 g de sulfate de sodium), et ce, dans le but d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les extraits bruts sont concentrés sous vide à 40 °C en utilisant un évaporateur rotatif (BUCHI). Le résidu sec est récupéré dans 2 ml de méthanol afin de le tester par antibiographie.

3.2. Antibiographie

Afin de déterminer le meilleur solvant d'extraction, Les extraits organiques obtenus à partir des filtrats sont testés par antibiographie contre les germes cibles les plus sensibles selon les résultats de l'antagonisme. La méthode utilisée est celle des disques de papier. Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imbibés par 100µL (pour le test antibactérien) ou 140 µL (pour le test antifongique) d'extrait puis séchés à froid à l'aide d'un séchoir jusqu'à l'élimination totale du méthanol. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface des milieux MH ou PDA semi-solides, préalablement ensemencé par les bactéries et le champignon respectivement. Celles-ci sont mises

à 4 °C pendant 2 h avant d'être incubées à 30 °C. La lecture des résultats est effectuée par la détermination du diamètre de la zone d'inhibition autour du disque après 24 h d'incubation pour les bactéries et 48 h pour le champignon.

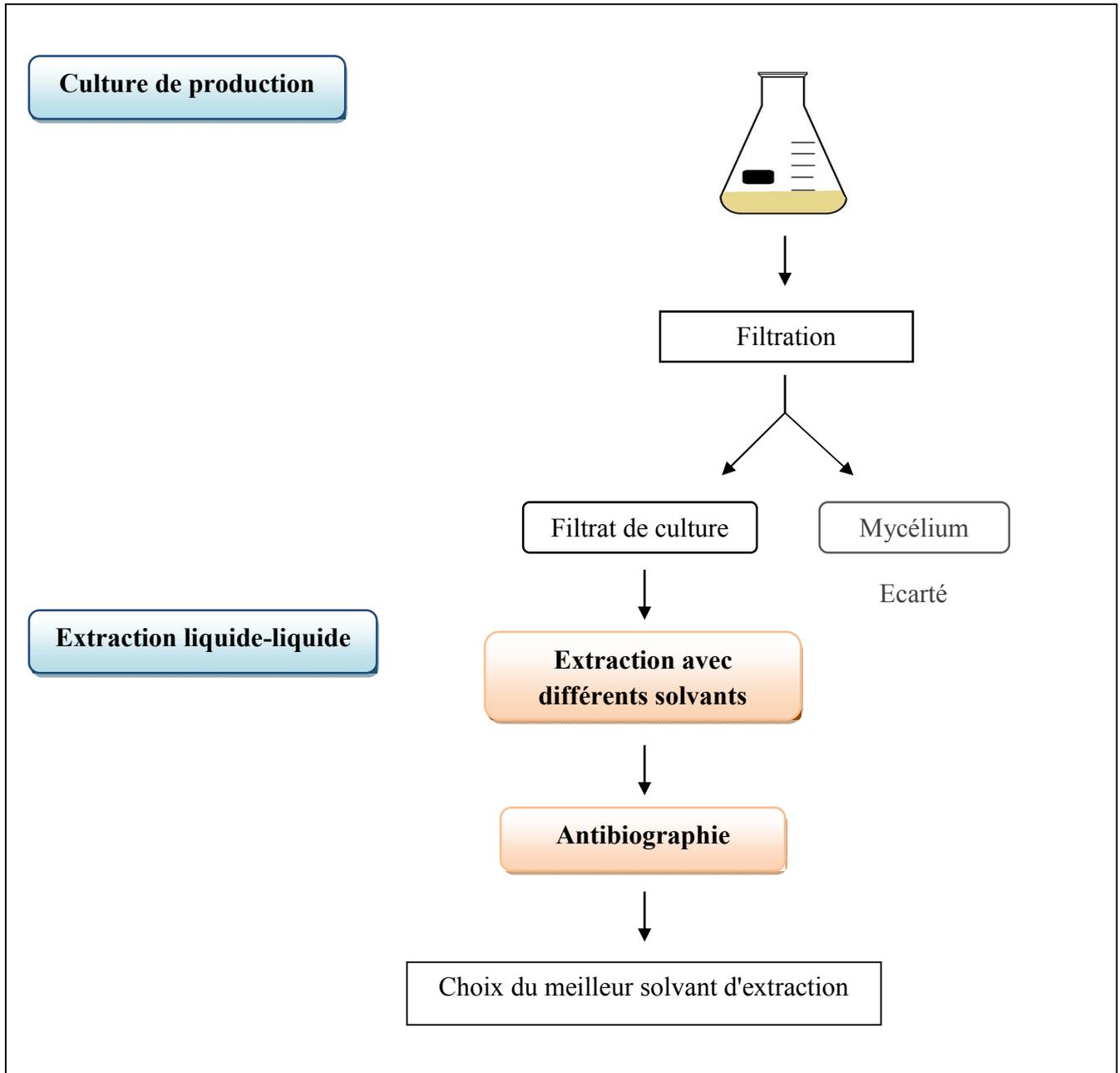


Figure 5. Schéma descriptif des étapes de l'extraction.

4. Analyse par HPLC

La chromatographie liquide à haute performance (HPLC) a été utilisée pour analyser les composés antibiotiques produits par la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. Pour cela, des cultures de productions des antibiotiques ont été réalisées en meilleur milieu de culture. Les antibiotiques

ont été extraits le jour de production optimale déterminé lors des cinétiques par le meilleur solvant d'extraction.

4.1. Appareillage

L'HPLC a été réalisée sur un appareil de marque Agilent® Technologies, équipé d'éléments suivants:

- Injecteur de type 1260 HTS relié à une boucle d'injection de 100 µL
- Passeur de type automatique 1260 Infinity
- Système de pompe quaternaire 1260 VL (capacité 600 bars et 4 solvants)
- Détecteur UV-visible: dual bande type Waters 2487 Détecteur DAD 1260 Infinity
- Dégazeur standard 1260 Infinity
- Une colonne à phase inverse, de type ZORBAX SB-C18 (5 µm, 9,4 x 250 mm), avec sa pré-colonne Waters XBridge C18 (5 µm, 10 x 10 mm)
- Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: ChemStation for LC 3D systems, version B. 04. 03 [16] (Agilent® Technologies).

4.2. Conditions expérimentales

L'extrait obtenu après une extraction par le meilleur solvant est analysé par HPLC. Les conditions d'analyse ont été déterminées comme suit:

La phase mobile est constituée d'un mélange d'eau bidistillée et de méthanol pour HPLC (éluant) préalablement filtrée et dégazée. Le mélange de la phase mobile eau/ méthanol évolue tout au long du programme d'élution selon un gradient continu, linéaire, allant de 20 à 100% de méthanol dans l'eau bidistillée pendant 50 min. Le débit de l'éluant est de 1 ml/min et la détection se fait à 220 nm.

Avant l'injection de l'échantillon, la colonne (phase stationnaire) est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 10 min. L'extrait est dissout dans 1 ml de méthanol, ultrafiltré à l'aide d'un filtre de 0,2 µm de porosité puis introduit dans l'injecteur de l'HPLC à raison de 80 µl par injection.

I. Résultats

1. Evaluation de l'activité antagoniste de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. sur milieu solide

La souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. a été testée pour son pouvoir antimicrobien par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu ISP2. Ce test c'est porté sur divers germes cibles comprenant des bactéries à Gram positif, des bactéries à Gram négatif et des champignons filamenteux. Les résultats sont illustrés par la figure 6.

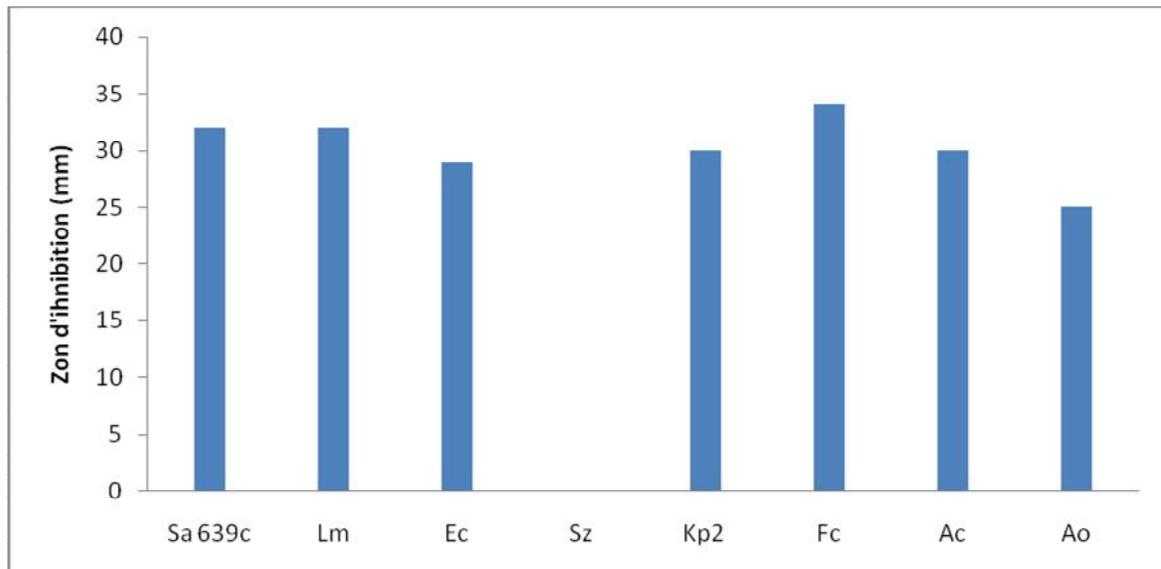


Figure 6. Activité antagoniste de la souche TAS18.

Lm : *Listeria monocytogenes* ATCC 13932;; **Sa 639c:** *Staphylococcus aureus* 639 c; **Ec:** *Escherichia coli*; **Kp2:** *Klebsiella pneumonia*; **Sz:** *Salmonella arizonae*; **Ac:** *Aspergillus carbonarius* M333;; **Ao:** *Aspergillus ochraceus*; **Fc:** *Fusarium culmorum*.

Les résultats obtenus montrent que la souche TAS18 présente une activité antagoniste variée et intéressante. En effet, elle est importante contre les champignons filamenteux où les valeurs d'inhibition varient de 25 jusqu'à 32 mm. La meilleure activité antifongique est obtenue contre *Fusarium culmorum*. L'activité est également bonne contre les bactéries à Gram positif, les zones d'inhibition oscillent entre 20 et 32 mm. *Listeria monocytogenes* ATCC 13932 et *Staphylococcus aureus* 639c étant les plus sensibles. Quant aux bactéries à Gram négatif, la souche s'est montrée active contre *Escherichia coli*, et *Klebsiella pneumonia* (26 à 30 mm) cependant, *Salmonella arizonae* est révélée résistante.

2. Cinétiques de production des antimicrobiens en milieux liquides

2.1. Cinétique de production en milieu ISP2

Le milieu ISP2 est un milieu complexe à base de glucose, d'extrait de levure et d'extrait de malt. Il a permis d'avoir une croissance et une production d'antibiotiques assez importante. Les résultats de cinétiques des activités antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 sont illustrés par la figure 7.

La courbe de croissance est caractérisée par deux périodes distinctes, la première période s'étale entre le 1^{er} et le 5^{ème} jour où la croissance est relativement faible alors que durant la deuxième période (J5 - J8) une forte croissance est observée.

Dans ce milieu de production, les activités antibactériennes et antifongique sont assez fortes et apparaissent entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour avec un maximum au 7^{ème} jour. La production maximale a eu lieu dans la phase exponentielle de croissance.

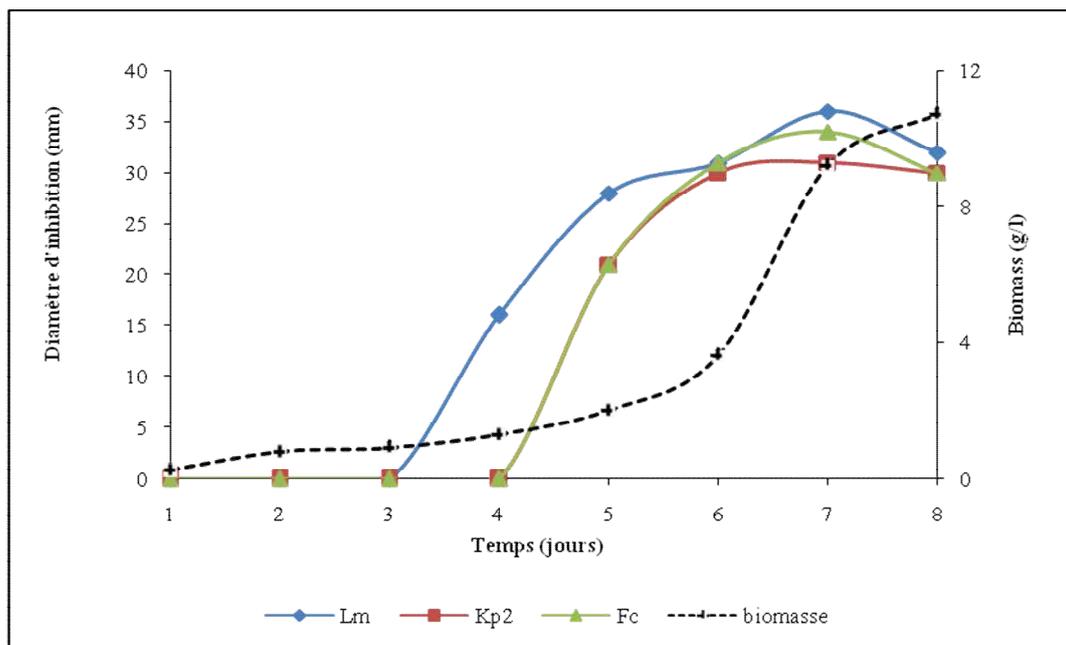


Figure 7. Cinétiques de production des substances antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. cultivée dans le milieu ISP2.

2.2. Cinétique de production en milieu semi-synthétique

La croissance de la souche TAS18 sur le milieu MSS est relativement faible, la biomasse maximale est obtenue sur le milieu additionné de glucose (3,35 g/l). En effet, dans l'ensemble des milieux semi-synthétiques testés on distingue deux grandes étapes, une première qui se

caractérise par un accroissement rapide (phases d'accélération et exponentielle confondues) et une deuxième étape marquée par une diminution de la croissance (phase de déclin). Les résultats de la cinétique de croissance et des activités antimicrobiennes sont illustrés par les figures 8 et 9.

L'activité antibactérienne débute plus rapidement (2^{ème} jours) en présence de sucres non complexes (glucose et saccharose) qu'en présence de sucres plus complexes (3^{ème} et 4^{ème} jours). Les maxima de production sont globalement obtenus entre le 3^{ème} et le 4^{ème} jour. Alors que l'activité antifongique commence plus tardivement (3^{ème} et 4^{ème} jours) pour la majorité des sucres testés à l'exception du glucose (2^{ème} jour) et atteint son maximum entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour.

Parmi toutes les variantes de sucres testées en milieu semi-synthétique, le glucose s'est montré favorable pour la production des antibiotiques aussi bien de point de vue de la rapidité de la production que l'intensité de l'activité.

Nous notons également que la production des antibiotiques a commencée dans la phase de déclin dans tous les milieux testés.

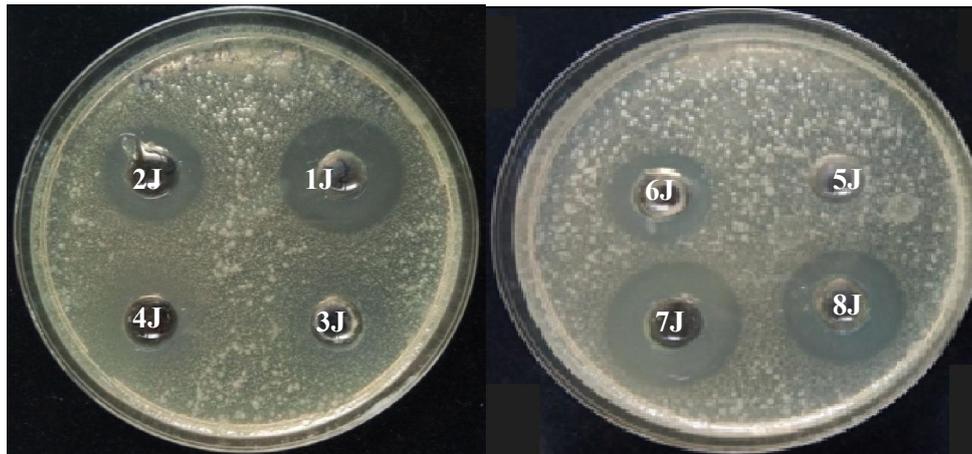


Figure 8. Activité antibactérienne de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp., cultivée dans le milieu semi-synthétique additionné de glucose, contre *Listeria monocytogenes* par la méthode de diffusion des puits.

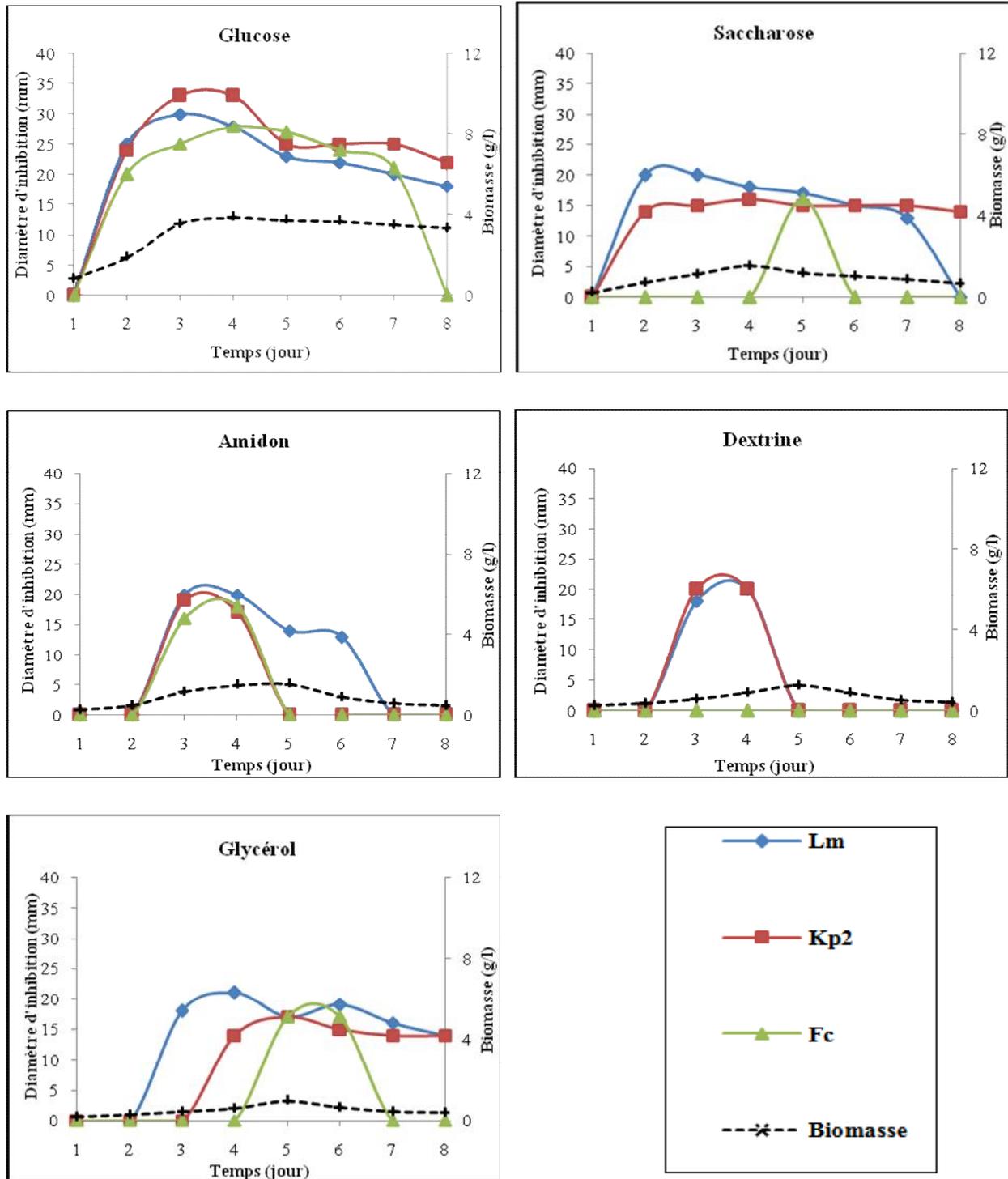


Figure 9. Cinétiques de production des substances antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. cultivée dans le milieu semi-synthétique avec différentes sources de carbone.

2.3. Cinétiques de production en milieu synthétique

Le suivi de la production des antimicrobiens sur le milieu synthétique supplémenté de différents sucres (figures 10 et 11) a montré que seul le glucose et la dextrine ont permis d'obtenir des activités relativement intéressantes avec une nette rapidité dans la production en présence de glucose. En effet, l'activité antimicrobienne commence le 2^{ème} jour en présence de glucose et atteint le maximum entre le 4^{ème} et le 5^{ème} jour alors qu'elle n'est décelée qu'à partir de 7^{ème} jour en présence de dextrine avec un maximum entre le 10^{ème} et le 11^{ème} jour.

En ce qui concerne la croissance de la souche TAS18, dans l'ensemble des milieux synthétiques testés on distingue également deux grandes étapes, une première qui se caractérise par des phases d'accélération et exponentielle confondues et une deuxième étape marquée par une diminution de la croissance (phase de déclin).



Figure 10. Activité antimicrobienne de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp., cultivée dans le milieu synthétique additionné de glucose, contre *Listeria monocytogenes* par la méthode de diffusion des puits.

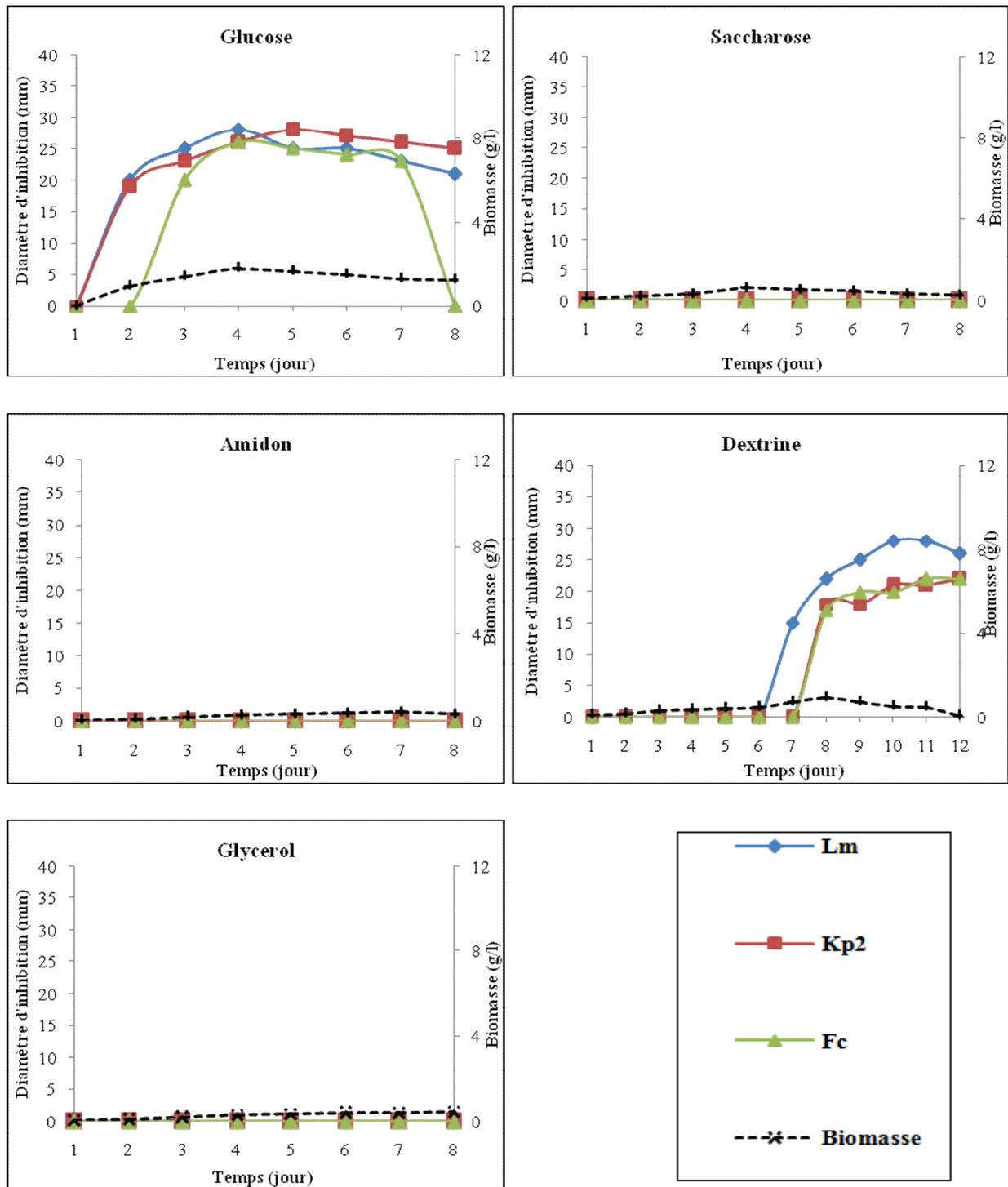


Figure 11. Cinétiques de production des substances antimicrobiennes et de croissance de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. cultivée dans le milieu synthétique avec différentes sources de carbone.

3. Extraction des antimicrobiens

Nous avons retenus pour la suite de notre étude les milieux MS-glucose et MSS-glucose vus la rapidité de l'obtention des maxima de production des antimicrobiens et la non disponibilité des composants du milieu ISP2.

Les activités sont extraites à partir du filtrat de culture au moment où la production d'antimicrobiens a été maximale (le 3^{ème} et le 4^{ème} jour pour les milieux MSS et MS respectivement). Les résultats de l'extraction des antibiotiques à activité antimicrobienne par les quatre solvants sont consignés dans le tableau 4.

Tableau 4. Activités antimicrobiennes des extraits organiques des filtrats de culture de la souche TAS18

Milieux d'extraction	Solvants d'extraction	Diamètre d'inhibition des microorganismes-cibles (en mm)		
		<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Fusarium culmorum</i>
MSS-Glucose	Acétate d'éthyle	27	42	-
	<i>n</i> -Butanol	30	60	-
	Dichlorométhane	15	36	-
	<i>n</i> -hexane	-	-	-
MS-Glucose	Acétate d'éthyle	11	8	-
	<i>n</i> -Butanol	17	10	-
	Dichlorométhane	21	21	-
	<i>n</i> -hexane	-	-	-

Le diamètre des disques de papiers (6 mm) est compris dans la mesure des activités. - : absence d'activité

Pour les deux milieux, l'activité antibactérienne est détectée dans les phases organiques des extraits au *n*-butanol, à l'acétate d'éthyle et au dichlorométhane, mais pas dans celle au *n*-hexane (figure 12).

En ce qui concerne le milieu MSS additionné de glucose les résultats ont montré que les trois solvants extraient l'activité contre *Klebsiella pneumoniae* et *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, avec de meilleurs résultats pour le *n*-butanol et l'acétate d'éthyle, et à un degré moindre, le dichlorométhane.

En ce qui concerne le milieu MS additionné de glucose, les résultats (Tableau 4) montrent que le meilleur solvant d'extraction de l'activité antibiotique est le dichlorométhane (21 mm contre Lm et 20 mm contre Kp2).

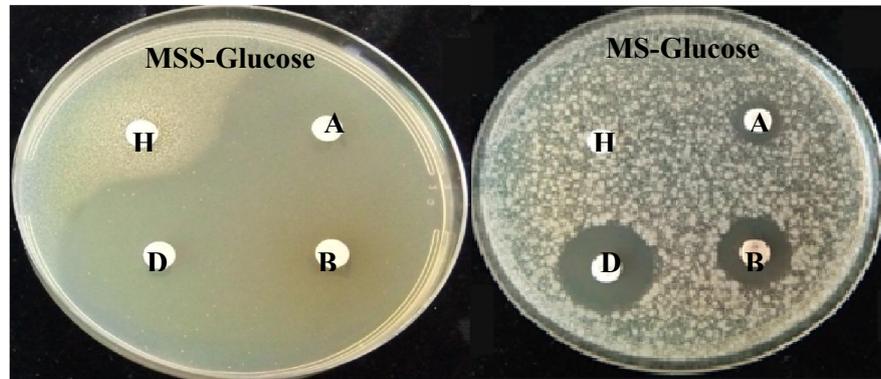


Figure 12. Activité antibactérienne des différents extraits de la phase organiques à partir des milieux synthétique et semi-synthétique additionnés de glucose contre *Klebsiella pneumoniae* (à droite) et *Listeria monocytogenes* (à gauche)

A: Acétate d'éthyle, B: *n*-Butanol, D: Dichlorométhane, H: *n*-hexane

4. Analyse par HPLC

L'analyse par HPLC n'a été réalisée que pour les extraits au dichlorométhane et l'acétate d'éthyle obtenus à partir des cultures de la souche TAS18 poussant sur le milieu MS-glucose et le milieu MSS-glucose, respectivement. Les précédent travaux effectués au laboratoire LBSM ont toujours montré que le *n*-butanol extrait beaucoup d'impuretés, et suite à ça, les analyses par HPLC n'ont pas été faites pour cet extrait malgré qu'il a donné de meilleurs résultats pour le milieu MSS-glucose. Les extraits analysés sont concentrés à sec à l'évaporateur rotatif, récupérés dans un minimum de méthanol. Le volume récupéré est filtré puis injecté à l'HPLC. La phase mobile utilisée est un gradient méthanol-eau bidistillée (20-100%) pendant 50 min avec une détection

UV se fait à 220 nm. Après l'écoulement du temps mort, des pics sont matérialisés sur le chromatogramme. Les profils sont illustrés par la figure 14 (pour l'extrait de milieu MSS-glucose) et la figure 15 (pour l'extrait du milieu MS-glucose).

Le profil correspondant à l'extrait de milieu MSS-glucose est très chargé et les pics ont un temps de rétention très proche entre eux ainsi que nous pouvons observer des pics majoritaires et des pics minoritaires. On note également la présence des complexes hydrophiles et hydrophobes. Cependant, l'extrait de milieu MS-glucose est moins chargé contenant des composés

hydrophobes en majorité. Donc, les extraits ont présenté des profils différents. Par ailleurs, une ressemblance entre les 2 profils d'éluion est observée entre 40 et 50 minutes.

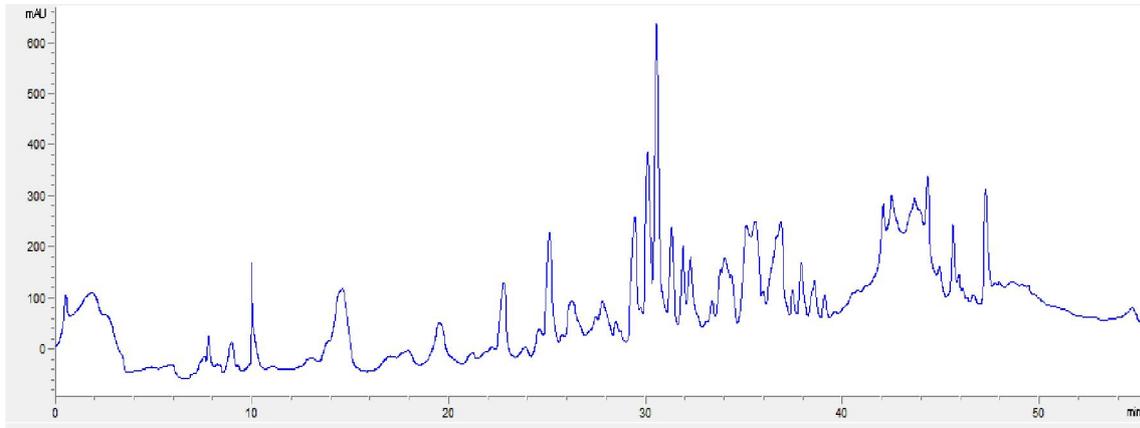


Figure 13. Profil d'éluion en HPLC de l'extrait à l'acétate d'éthyle de la souche TAS18 d'*Actinomadura* cultivée pendant 3 jours à 30°C et 250 rpm sur le milieu semi-synthétique additionné de glucose

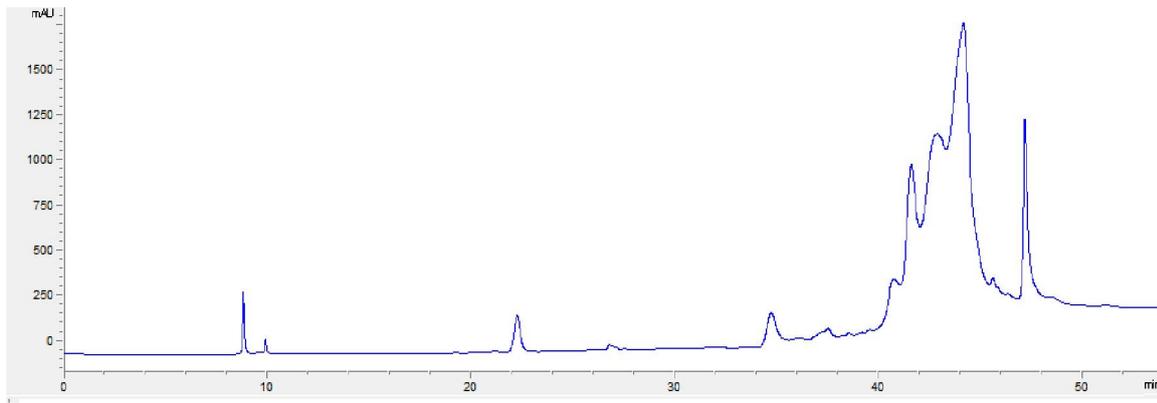


Figure 14. Profil d'éluion en HPLC de l'extrait au dichlorométhane de la souche TAS18 d'*Actinomadura* cultivée pendant 4 jours à 30°C et 250 rpm sur milieu synthétique additionné de glucose.

II. Discussions

La souche TAS18 étudiée possède des potentialités inhibitrices importantes contre les différents groupes microbiens, ce qui démontre son large spectre d'action. Cette souche a surtout inhibée les champignons filamenteux et les bactéries à Gram positif et à un degré moindre les bactéries à Gram négatif, ce qui concorde avec les résultats obtenus par d'autres chercheurs (Badji, 2006; Lahoum, 2017).

Plusieurs espèces appartenant aux genres *Actinomadura* sont connues par leur importance dans la production des antifongiques comme l'ont déjà signalé, Lahoum *et al.* (2016), Paudel *et al.* (2016) et Bunyapaiboonsri *et al.* (2017). Dans notre cas, la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. s'est montrée active contre tout les champignons testés avec une grande activité obtenue contre *Fusarium colmorum* un champignon pathogène des céréales mais aussi toxigène, très largement répandu sur les culture céréalières, particulièrement difficile à combattre lors d'infestation en plein champs et dont la production de toxines sur les grains contaminés est susceptible d'entrer dans la chaîne alimentaire en engendrant un risque sanitaire avéré.

Les bactéries à Gram positif se sont montrées très sensibles contrairement aux bactéries à Gram négatif dont certaines se sont montrées très résistantes. La plus grande résistance des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif est un phénomène connu (Prescott *et al.*, 2002). Les premières possèdent une enveloppe cellulaire sujette à de nombreux mécanismes de résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques (Gupta *et al.*, 2011). Chez ce groupe de bactéries, l'enveloppe comprend la membrane externe, le périplasme et la membrane cytoplasmique; la perméabilité des deux membranes joue un rôle majeur dans la sensibilité. Elle peut en effet moduler la diffusion de l'antibiotique lors de son entrée, et réguler aussi son expulsion. Les porines situées dans la membrane externe et les pompes d'efflux sont parmi les voies principales de ce transport (Pagés et Garnotel, 2003).

De bonnes activités ont été obtenues contre *Listeria monocytogenes* ATCC 13932, *Staphylococcus aureus* ATCC43300 et *Klebsiella pneumonia* donc la souche TAS18 peut constituer une source prometteuse de composés antibactériens contre ces germes qui sont impliquées dans plusieurs pathologies et dont certaines connaissent l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques.

Les cinétiques de croissance et de production des antimicrobiens ont été menées sur milieu complexe ISP2, milieu synthétique et milieu semi-synthétique. Pour ces deux derniers milieux, cinq sources de carbones ont été testées.

Concernant la cinétique de croissance, nous notons certains points communs dans les différents milieux de culture, comme par exemple, l'absence d'une phase de latence. Cette phase est connue pour correspondre au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture ainsi qu'à l'âge de l'inoculum. Elle est observée surtout lorsque l'inoculation est réalisée avec des spores ou des précultures âgées ou préparées dans des conditions différentes. L'absence de cette phase est donc expliquée par le fait que nos précultures soient menées dans les mêmes conditions que les cultures (même milieu) et qu'elles soient prises en phase exponentielle de croissance (précultures fraîches de quatre jours de croissance). La croissance est également caractérisée par l'absence de la phase stationnaire, c'est le cas de nombreuses souches d'actinobactéries tels que *Actinomadura* (Badji *et al.*, 2007), *Streptosporangium* (Boudjella *et al.*, 2007), *Sacharothrix* (Boubetra *et al.*, 2013) et *Streptomyces* (Aouich *et al.*, 2014).

L'autre point commun est celui de la production des antimicrobiens au cours de la phase exponentielle. Contrairement à ce phénomène, la production des métabolites secondaires par les microorganismes a lieu généralement durant les phases de ralentissement et stationnaire. Cependant, dans le cas des actinobactéries, le moment de production est variable: il peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire ou de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

Le milieu ISP2 s'est avéré très favorable pour la croissance ainsi que la production des antimicrobiens par la souche TAS18. Le même résultat est obtenu par de nombreux chercheurs (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007; Toumatia, 2015; Lahoum, 2017). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que ce milieu est riche en nutriments et fournit des facteurs de croissance et des composants qui jouent un rôle éventuel en tant que précurseurs d'antibiotiques.

Les résultats de cinétique révèlent que la croissance et la biosynthèse des antibiotiques peut être considérablement influencée par la composition de milieu de culture. Plusieurs travaux rapportent l'influence des sources de carbone et d'azote sur la production d'antibiotiques (Aharonowitz et Demain, 1978; Aharonowitz et Demain, 1979; Aharonowitz, 1980; Demain, 1982; Lebrihi *et al.*, 1988; Khaoua *et al.*, 1991).

Pour les cinétiques en milieu MS et MSS, le glucose s'est révélé la meilleure source de carbone. Ces résultats sont parfaitement en accord avec ceux obtenus par Lamari (2006) lors de l'étude de la production des antibiotiques par *Sacharothrix algeriensis*, ainsi que ce de Arasu *et al.* (2014) lors de l'étude des activités antimicrobiennes par les souches ERI-1, ERI-3, ERI-26 de *Streptomyces*. Nos résultats corrélerent aussi avec ceux obtenus par El-Mehalawy *et al.*

(2005) lors de la production des antifongiques par *Streptomyces lydicus*, *S. ederenensis*, *S. erumpens* et *S. antimycoticus*. En revanche, d'autres travaux indiquent que le glucose exerce une action négative sur la biosynthèse des antibiotiques. Il diminue la production de l'oléandomycine (Vilches *et al.*, 1990), de la spiramycine (Lounes *et al.*, 1996), de la nystatine (Jonsbu *et al.*, 2002), de l'avilamycine (Zhu *et al.*, 2007) et de la néomycine (Vastrad *et al.*, 2011). Dans ces cas, le glucose réprime la biosynthèse des antibiotiques en inhibant les enzymes impliquées. Par exemple, le glucose a un effet négatif sur l'action de phénoxazinone synthétase et N-acétyl kanamycine amidohydrolase, deux enzymes impliquées dans les voies de biosynthèse de l'actinomycine et de la kanamycine, respectivement (Galo *et al.*, 1972; Satoh *et al.*, 1976). Cet effet est dépendant de la dose puisque plusieurs auteurs ont constaté que les fortes concentrations de glucose ou d'autres sources carbonées rapidement catabolisables sont généralement défavorables à la production (Martin et Demain, 1980; Demain *et al.*, 1983).

Dans notre cas, il semblerait que le glucose n'exerce pas d'effet répressif sur la production de molécules antimicrobiens par la souche TAS18 à la concentration de 10 g/l. Cependant il faut noter que la production des antibiotiques en milieu ISP2 contenant 4g de glucose est meilleur qu'en milieu MSS qui en contient 10g.

Par ailleurs, nos résultats montrent que des activités antimicrobiennes moins importantes qu'avec le glucose, mais qui restent appréciables, ont été obtenues avec l'amidon, le glycérol et le saccharose sur milieu semi-synthétique et avec la dextrine dans le milieu synthétique. Des travaux ultérieurs ont montré que les sucres sus-cités peuvent favoriser la production des antibiotiques ou l'inverse, la réprimer, cela dépend des souches étudiées (patrimoine génétique différent).

Par exemple une étude sur la production des antibiotiques par *Saccharotrix albidoflavus* C247 (Islam *et al.*, 2009) a fait ressortir le saccharose comme meilleur source de carbone. D'autre part les faibles diamètres obtenus avec le saccharose sont en accord avec ceux d'Ababutain *et al.* (2013); Arasu *et al.* (2014), qui rapportent que les plus faibles productions des activités antimicrobiennes ont été obtenues avec le saccharose.

L'activité antimicrobienne est meilleure sur les milieux ISP2 (contenant l'extrait de levure comme sources d'azote) et MSS-glucose (contenant le sulfate d'ammonium et l'extrait de levure comme sources d'azote) que sur le milieu MS-glucose (contenant le sulfate d'ammonium comme seule source d'azote). La production moindre des antimicrobiens dans le milieu MS pourrait être expliquée par le manque de l'extrait de levure qui jouerait un rôle déterminant dans la synthèse des antimicrobiens. L'extrait de levure, de part de sa composition, constitue une source d'azote

riche et diversifiée très utilisée pour la production des antibiotiques (Isshiki *et al.*, 1989; Takeuchi *et al.*, 1992; Kinoshita *et al.*, 1999; Vertesy *et al.*, 2001; Lamari *et al.*, 2002 ; Pandey *et al.*, 2005 ; Gao *et al.*, 2009). Cependant, le résultat obtenu sur le milieu MS-glucose est aussi intéressant, surtout de point de vue économique. En industrie pharmaceutique et en biotechnologie, l'utilisation de composés peu coûteux est recherchée préférentiellement dans la préparation des milieux de fermentation et dans un but de production.

Les maxima de production des antimicrobiens sont obtenus après 3 jours (milieu MS-Glucose), 4 (milieu MS-Glucose) et 7 jours d'incubation (milieu ISP2). Ce sont des temps moyens puisque le maximum de production des antibiotiques en milieu liquide chez les actinobactéries, varie de 3 jours à 2 semaines. Nous pouvons citer comme exemples celui des arylomycines (produites par une souche de *Streptomyces*) qui est de 3 jours d'incubation (Schimana *et al.*, 2002) et celui de la pradimicine S (produit par une souche d'*Actinomadura*) qui est de 12 jours (Saitoh *et al.*, 1993).

De façon générale, on peut dire qu'à l'instar des études cinétiques, les milieux ISP2, MSS-glucose et MS-glucose sont des milieux favorables pour la production des antimicrobiens par la souche TAS18.

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

- Le solvant doit extraire une bonne activité antimicrobienne.
- Le solvant doit extraire le moins d'impuretés possibles, comme c'est le cas pour le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle (connu pour cette propriété) comme l'ont souligné Zitouni (2005) et Lamari (2006), contrairement au *n*-butanol (Badji, 2006), et ce, pour faciliter le processus de purification par HPLC. De ce fait, l'acétate d'éthyle et le dichlorométhane ont été retenus comme solvants d'extraction du filtrat de culture pour les milieux MSS et MS supplémenté de glucose respectivement, même si son pouvoir d'extraction est légèrement moindre que celui de *n*-butanol.

Après antibiographie, nous constatons que les quatre extraits organiques obtenus avec les différents solvants utilisés ne possèdent aucune activité antifongique. Ceci indique que ces solvants n'extraient pas les antifongiques produits par la souche TAS18. Ainsi, l'absence de cette activité au niveau des phases organiques atteste de la nature très hydrophile des antifongiques produits par la souche TAS18. En effet, même le *n*-butanol, solvant pourtant connu pour extraire de nombreux composés à polarité moyenne (Zitouni, 2005; Badji, 2006), n'a permis aucune extraction de composés antibiotiques produits par cette souche.

L'analyse par HPLC des extraits de la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. poussant sur les milieux MSS-glucose et MS-glucose a révélé la présence de plusieurs pics. Ces pics peuvent

correspondre à plusieurs antibiotiques. En effet, plusieurs espèces d'actinobactéries appartenant à des genres différents sont capables de sécréter de nombreux antibiotiques: une quinzaine ou plus chez *Saccharothrix* sp. SA103 (Zitouni, 2005) et *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137 (Lamari, 2006), plus d'une trentaine chez *Nonomuraea* sp. (Badji, 2006), au minimum quatre chez *Streptomyces* sp. AA1 (Toumatia, 2010) et trois chez *Streptomyces* sp. GB1 (Driche, 2010). D'autres souches ne produisent qu'un seul composé antibactérien, comme *Saccharothrix* sp. PAL54 et PAL42 (Aouiche, 2011). En revanche, ces pics peuvent être inactifs, seul le test d'antibiogramme des molécules purifiées par HPLC peut nous renseigner sur le nombre d'antibiotique produit par la souche TAS18.

Conclusion et perspectives

La production d'un antibiotique en quantité appréciable exige l'utilisation de méthodes d'amélioration de la production. L'une d'elles consiste en la recherche des conditions de culture favorables à cette amélioration. Dans cette optique, notre contribution a porté sur l'étude de la production d'antibiotiques par la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. Nous nous sommes donc intéressés aux facteurs nutritionnels influençant cette production, à savoir les sources de carbone et d'azote.

Nous avons déterminé l'activité antimicrobienne de la souche TAS18 sur milieu ISP2 solide par la méthode des cylindres d'agar ce qui nous a permis de sélectionner parmi les germes cibles les plus sensibles *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumonia* et *Fusarium culmorum* pour la suite de notre étude.

L'étude des cinétiques de production des antibiotiques de la souche TAS18 sur différents milieux nous ont permis d'obtenir le milieu ISP2 ainsi que les milieux semi-synthétique (MSS) et synthétique (MS) additionnés de glucose comme étant les meilleurs milieux de production après des temps d'incubations différents allant de 3 à 7 jours.

La suite de notre travail a été effectuée sur les milieux MSS et MS, qui donne des résultats appréciables après 3 à 4 jours d'incubation uniquement. L'activité antibiotique de la souche TAS18 cultivée sur ces milieux a été efficacement extraite par l'acétate d'éthyle pour le milieu MSS et le dichlorométhane pour le milieu MS. L'analyse par HPLC de ces extraits a montrée la présence de plusieurs composés dans le milieu semi-synthétique par rapport au milieu synthétique.

A la fin de ce travail, nous pouvant retenir le milieu semi-synthétique contenant le sulfate d'ammonium et l'extrait de levure comme sources d'azote et le glucose comme source de carbone comme milieu favorable à la production des antibiotiques pour la souche TAS18 d'*Actinomadura*.

Notre travail ne représente qu'une étude préliminaire de la production d'antibiotiques par la souche TAS18 d'*Actinomadura* sp. Les perspectives qui en découlent sont nombreuses. Il serait donc intéressant pour la suite de ce travail :

- De produire des antibiotiques en testant différentes combinaisons des paramètres cultureux principaux définies (sources de carbones et d'azote) par une approche de statistique

expérimentale de plan d'expérience et une analyse de model quadratique (méthode de réponse de surface),

- De tester d'autres sources nutritionnelles telles que les oligoéléments, le phosphate et le potassium,
- De purifier des antibiotiques produits par la souche TAS18 et la détermination de leur structure chimique,
- De déterminer des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques purifiés.

Références bibliographiques

- Ababutain I.M., Abdul Aziz Z.K. and AL-Meshhen N.A. (2013).** Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by *Streptomyces* sp. isolated from Saudi Arabia Soil. *Inter. Research J. Microbiol.* **4**: 179-187.
- Abbas S., Subhan M., Durrani F., Mehmood S., Khan H. and Hameed A. (2010).** Biosynthesis of antibiotic through metabolism of actinomycetes strain MH-9 through shake flask fermentation. *Sarhad J. Agric.*, **26**: 7-18.
- Accoceberry I. et Noël T. (2007).** Antifongiques: cibles cellulaires et mécanismes de résistances. *J. Pharm. Clin.* **3**:195-199.
- Adegboye M.F. and Babalola O.O. (2012).** Taxonomy and ecology of antibiotic producing actinomycetes. *Afr. J. Agric. Res.* **7**(15):2255-2261.
- Agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Mycobiol.*, **37**: 114-120.
- Aharonowitz Y. (1980).** Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Ann. Rev. Microbiol.*, **34**: 209-233.
- Aharonowitz Y. and Demain A.L. (1978).** Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **14**: 159-164.
- Allison D.G. and Lambert P.A. (2015).** Modes of Action of Antibacterial Agents. *Molecular Medical Microbiology.* 583:598.
- Aouiche A. (2011).** 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. p 127.
- Aouiche A., Bijani C., Zitouni A., Mathieu F. and Sabaou N. (2014).** Antimicrobial activity of saquayamycins produced by *Streptomyces* sp. PAL114 isolated from Saharan soil. *J Mycol Med.* **24**: 17-24.
- Arasu M.V., Rejiniemon T.S., Al-Dhabi N.A., Duraipandiyam V., Ignacimuthu S, Agastian P., Kim S., Huxley A.J., Lee K.D. and Choi K.C. (2014).** Nutritional requirements for the production of antimicrobial metabolites from *Streptomyces*. *African. J. Microbio. Research.*, **8**: 750-758.
- Arifuzzaman M., Khatun M.R. and Rahman H. (2010).** Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *Afr. J. Biotechnol.* **9**:4615-4619.

- Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin, E. and Tillequin F. (2007).** Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. J. Ind. Microbiol. Biotechnol., **34**: 403-412.
- Badji, B. (2006).** Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat. Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. p 226.
- Baltz R.H. (2007).** Antimicrobials from actinomycetes: back to the future. Microbe. **2**:125-131.
- Barakate M., Ouhdouch Y., Oufdou K. and Beaulieu C. (2002).** Characterization of rhizospheric soil Streptomyces from Moroccan habitats and their antimicrobial activities. World J. Microbiol. Biotechnol. **18**:49-54.
- Barka E.A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H.P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G.P. (2016).** Taxonomy, physiology, and natural products of Actinobacteria. Microbiol. Mol. Biol. Rev. **80**: 1-43.
- Barrial *et al.*, 2005
- Barrios-Gonzalez J., Fernandez F.J., Tomosini A. and Megia A. (2005).** Secondary metabolites production by solid-state fermentation. Malaysian J. Microbiol. **1**: 1-6.
- Bauda P et Monfort P. (2004).** Agents pathogènes et modification des environnements : quel risques actuels et futures ?. Environnement, Risques & Santé. **3**(3). 165-72.
- Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K. L. (1987).** CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. 13. Microbial metabolites. part 1,2,3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition Vol 5. (2012).** The Actinobacteria. Editors: Whitman W. B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M. E., Ludwig W. Suzuki K.-I., Parte A., p.2083.
- Bhattacharjee K., Kumar S., Palepu N.R., Patra P.K., Rao M.K. and Joshi S. R. (2017).** Structure elucidation and in silico docking studies of a novel furopyrimidine antibiotics synthesized by endolithic bacterium *Actinomadura* sp. AL2. World J. Microbiol. Biotechnol. **33**:178.
- Boubetra D., Zitouni A., Bouras N., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H.P. and Sabaou N. (2013).** *Saccharothrix saharensis* sp. nov., an actinomycete isolated from Algerian Saharan soil. Int.J. Syst. Evol. Microbiol., **63** (10): 3744-3749.
- 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. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. P 188.

- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. and Sabaou, N. (2007).** Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *J. Appl. Microbiol.*, **103**: 228-236.
- Boukhalfa Bennai S.A. et Serradj S. (2016).** Les infections bactériennes dans un service d'orthopédie : isolement, identification et profils de résistance. Mémoire pour l'obtention de diplôme de master . Université Blida 1.90p.
- Brown E.D. and Wright G.D. (2016).** Antibacterial drug discovery in the resistance era. *Nature.*, Vol 529 : 336-343.
- Brown, D.E. and Zainudeen, M.A. (1978).** Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.* 20: 1045-1061.
- Bull A.T., Stach J.E.M., Ward A.C and Goodfellow M. (2005).** Marine actinobacteria: perspectives, challenges, future directions. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **87**:65-79.
- Bunyapaiboonsri T., Yoiprommarat S., Suriyachadkun C., Supothina S., Chanthaket R., Chutrakul C. and Vichai V. (2017).** Actinomadurone, a polycyclic tetrahydroxanthone from *Actinomadura* sp. BCC 35430. *Tetrahedron Lett.* **58** : 3223-3225.
- Bycroft B. W. (1988).** Dictionary of antibiotics and related substances. Chapman and Hall (Eds). London, 944 p.
- Cai Y., Xue Q., Chen Z. and Zhang R. (2009).** Classification and salt-tolerance of actinomycetes in the Qinghai Lake water and Lakeside saline soil. *J. Sustainable Dev.* 2: 107-110.
- Cavallo J.D., Fabre R., Jehl F., Rapp C. et Garrabé E. (2004).** Bétalactamines. EMC-Maladies infectieuses. 1:129-202.
- Chavan V.D., Mulaje S.S. and Mohalkar R.Y. (2013).** A review on actinomycetes and their biotechnological application. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* **4**:1730-1742.
- Clardy J., Fishbach A.M. and Walsh T.C. (2006).** New antibiotics from bacterial natural products. *Nature Biotechnol.*, **24**:1541-1550.
- Cortès J., Liras P., Castro J.M. and Martin J.M. (1986).** Glucose regulation of cephamycin biosynthesis in *Streptomyces lactamdurans* exerted on the formation of alpha-amino adipyl-cysteinyl-valine and deacetoxycephalosporin C synthase. *J. Gen Microbiol.* 132: 1805-1814.
- Cosivi O., Grange J. M., Daborn C. J., Raviglionne M. C., Fujikura T., Cousins D., Robinson R. A. , Huchzermeyer H. F., de Kantor I., and Meslin F. X. (1998).** Zoonotic tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis.* **4**(1): 59-70.

- Daniel R. (2004).** The soil metagenome, a rich resource for the discovery of novel natural products. *Cur. Opin. Biotech.*, **15**:199-204.
- Das S., Lyla P.S. and Khan S.A. (2008).** Distribution and generic composition of culturable marine actinomycetes from the sediments of Indian continental slope of Bay of Bengal Chinese. *Chin. J. Oceanol. Limnol.* **26**(2):166-177.
- Delaunay S., Rondags E. et Germain P. (2003).** Production d'antibiotiques par biotechnologies. *Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique.* J6008: 1-12.
- Demain A. L. (1999).** Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **52**: 455-463.
- Demain A.L. (1982).** Catabolite regulation in industrial microbiology. In: *Overproduction of microbial products.* (Krumphanzl V., Sikyta B., Vanek Z., Eds), pp. 3-19. Academic Press: London.
- Demain A.L. and Sanchez S. (2009).** Microbial drug discovery: 80 years of progress, *J. Antibiot.* **62**:5-16.
- Demain A.L., Aharanowitz Y. and Martin J.F. (1983).** - Metabolite control of secondary biosynthetic pathways. In: Vining (Ed.) *Biochemistry and genetic regulation of commercially important antibiotics.* Addison-Wesley, London, p 49-67.
- Driche E. (2010).** Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. p 121.
- Euzéby J.P. (2018).** List of bacterial names with standing in nomenclature. <http://www.bacterio.cict.fr/>.
- Galo M. and Katz E. (1972).** Regulation of secondary metabolite biosynthesis. Catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J. Bacteriol.*, **109**: 659-667.
- Gao H., Liu M., Liu J., Dai H., Zhou X., Liu X., Zhou Y., Zhang W. and Zhang L. (2009).** Medium optimization for the production of avermectin B1a by *Streptomyces avermitilis* 14-12A using response surface methodology. *Bioresour. Technol.*, **100** : 4012-4016.
- Garrity G.M., Bell J.A. and Lilburn T.G. (2004).** Taxonomic Outline of the Procaryotes, *Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology.* Second Edition Release 5.0, Springer-Verlag, New York. pp 1-399.

- Genilloud O ., González I., Salazar O., Martín J., Tormo J.R., Vicente F. (2010).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. **38** (1) : 375-389.
- Genilloud O., Gonzales I., Salazar O., Martin J., Tormo J.R. and Vicente F. (2011).** Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **38**:375-389.
- George M., Anjumol A., George G. and Mohamed Hatha A. A. (2012).** Distribution and bioactive potential of soil actinomycetes from different ecological habitats. *Afr. J. Microbiol. Res.* **6**:2265-2271.
- Goodfellow M., (1983).** Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**:189-216.
- Gupta, R. S. (2011).** Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek.*, **100**: 171-182.
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1987).** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J. Ferm. Technol.* **65**: 501-509.
- He J., Xu Y., Sahu M.K., Tian X.P., Nie G.X., Xie Q., Zhang S., Sivakumar K. and Li W.J. (2012).** *Actinomadura sediminis* sp. nov., a marine actinomycete isolated from mangrove sediment. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62** :1110-1116.
- Hong, K., Gao, A. H., Xie, Q. Y., Gao, H. G., Zhuang, L., Lin, H. P., et al. (2009).** Actinomycetes for marine drug discovery isolated from mangrove soils and plants in China. *Mar. Drugs* **7** : 24-44.
- Islam M R., Y T Jeong., Y J Ryu., C H Song and Y S Lee. (2009).** Isolation, Identification and Optimal Culture Conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 Producing Antifungal
- Ispoglou S. S., Zormpalab A., Androulakic A. and Sipsasa N. V. (2003).** Madura foot due to *Actinomadura madurae* Imaging appearance. *J. Clin. Imag.* **27** (4): 233-235.
- Isshiki K., Sawa T., Naganawa H., Matsuda N., Hattori S., Hamada M. and Takeuchi T. (1989).** 3-O-isobutyrylkinamycin C and 4-deacetyl-4-O-isobutyrylkinamycin C, new antibiotics produced by a *Saccharothrix* species. *J. Antibiot.*, **42** (3): 467-469.
- Jiao J.Y., Liu L., Zhou E.M., Wei D.Q., Ming H., Xian W.D., Yuan. C.G., Zhong J.M and Li W.J. (2015).** *Actinomadura amylolytica* sp. nov. and *Actinomadura cellulolytica* sp. nov., isolated from geothermally heated soil. *Antonie van Leeuwenhoek.* **108**(1):75-83.
- Joffin J.N. et Leyral G. (2014).** Microbiologie technique - Tome 1, Dictionnaire des techniques. [Canopé - CRDP de Bordeaux](#). 368 p
- Jonsbu E., McIntyre M. and Neilson J. (2002).** The influence of carbon sources and morphology on nystatin production by *Streptomyces noursei*. *J. Biotechnol.*, **95**: 133-144.

- Jose P.A, Jebakumar S.R.D (2013)** Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front.Microbi.*
- Jose P.A. and Jebakumar S.R.D. (2013).** Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front. Microbiol.* **4**:240.
- Kathiravana M.K., Salake A.B.,Chothe A.S., Dudhe P.B., Watode R.P., Muktaa M.S. and Gadhwe S. (2012).** The biology and chemistry of antifungal agents: A review. *Bioorg. Med. Chem.* **20** :5678-5698.
- Khaoua S., Lebrihi A., Laakel M., Schneider F., Germain P. and Lefebvre G. (1991).** Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol.*, **136**: 763-767.
- Kinoshita N., Igarashi M., Ikeno S., Hori M. and Hamada M. (1999).** *Saccharothrix tangerinus* sp. nov., the producer of the new antibiotic formamicin: taxonomic studies. *Actinomyc.*, **13**: 20-31.
- Kohanski M.A., Dwyer D.J. and Collins J.J. (2010).** How antibiotics kill bacteria: from targets to networks. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**: 423-435.
- Lahoum A., Aouiche A., Bouras N., verheecke C., Klenk H.P., Sabaou N., Mathieu.F. (2006).** Antifungal activity of a Saharan strain of *Actinomadura* sp. ACD1 against toxigenic fungi and other pathogenic microorganisms *J.Mycol.Méd.*, **25**:191-200.
- Lahoum A., Bouras N.,Verheecke C., Mathieu F.,Schumann P., Spröer C., Klenk H.P., and Sabaou N. (2016).** *Actinomadura adrarensis* sp. nov., an actinobacterium isolated from Saharan soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **66** :2724-2729.
- Lahoum, A. (2017).** Souches d'actinobactéries mycéliennes des sols sahariens: mise en évidence de nouvelles espèces et de nouveaux antibiotiques et réduction de la concentration en aflatoxine B1.Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. P 269.
- Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat. Faculte des sciences biologiques et agronomiques. Tizi ouzou.176 p.
- Lambert A.P. (2005).** Bacterial resistance to antibiotics: Modified target sites. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **57**: 1471-1485.
- Larpent J.P et Sanglier J.J. (1989).** Biotechnologie des antibiotiques. Masson éditeurs. Paris. France.
- Larpent J.P. and Larpent-Gourgaud M. (1985).** Éléments de Microbiologie. Hermann Paris. 264 p.

- Larpent-Gourgaud M. et Sanglier J.J. (1992).** Biotechnologie. Principes et méthodes. Doin éditeurs. Paris. France.
- Lawford H.G., Rousseau J.D. (1997).** Corn steep liquor as a cost-effective nutrition adjunct in high-performance Zymomonas ethanol fermentations. Appl. Biochem. Biotechnol. 63-65, 287-304.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2000).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. 78(3-4):399-405.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2001).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. Antonie van Leeuwenhoek. 78: 399-405.
- Lebrihi A., Lamsaif D., Lefebvre G. and Germain P. (1992).** Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in Streptomyces ambofaciens. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 382-387.
- Lebrihi A., Lefebvre G. and Germain P. (1988).** Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in Streptomyces clavuligerus. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 44-51.
- Lechevalier H.A. and Lechevalier M.P. (1970).** A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales. Prauser H. (Eds.). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- Lee D.W. and Lee S.D. (2010).** *Actinomadura scrupulisp.* nov., isolated from rock. Int. J. Syst. Evol. Microbiol. 60 :2647-2651.
- Lee S.D. (2012).** *Actinomadura rupiterraesp.* nov., isolated from cliff soil. nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol., 62: 990-995.
- Lewin G., Carlos C., Chevrette M.G., Horn H.A., McDonald B.R., Stankey R.J., Fox B.G. and Currie C.R. (2016).** Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. Annu. Rev. Microbiol. 70:235-54.
- Li J., Guo-Zhen Z., Hai-Yu H., Sheng Q., Wen-Yong Z., Li-Xing Z., Li-Hua X. Si Z., Wen-Jun L. and Gary S. (2012).** Isolation and characterization of culturable endophytic actinobacteria associated with Artemisia annua L. Antonie Leeuwenhoek. 101:515-527.
- Lindholm P., Kortemaa H., Kokkola M., Haahtela K., Salkinoja-Salonen M. and Valkonen JPT. (1997).** *Streptomyces* spp. isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. Plant Dis. 81:1317-1322.
- Livermore D.M. (2009).** Has the era of untreatable infections arrived ?. J. Antimicrob. Chemother. 64 :129-136.

- Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. and Germain P. (1995).** Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, **31**: 304-311.
- Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. and Germain P. (1996).** Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: effects of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 204-211.
- Martin J.F. and Demain A.L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**, 230-251.
- Martin J.F. and Demain A.L. (1980).** Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.*, **44**: 230-251.
- Miyadoh S., Amano S., Tohyama H. and Shomura T. (1987).** *Actinomadura atramentaria*, a new species of the Actinomycetales. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **37** (4): 342-346.
- Mohammadipanah F. and Wink J. (2016).** Actinobacteria from arid and desert habitats: diversity and biological activity. *Front. Microbiol.* **6**: 1541.
- Naikpatil S.V. and Rathod J.L. (2011).** Selective isolation and antimicrobial activity of rare actinomycetes from mangrove sediment of Karwar. *J. ecobiotechnol.* **3**(10):48-53.
- Normand P. and Benson D.R. (2012).** *Bergey Manual of Systematic Bacteriology, The Actinobacteria* (2^{ème} Eds) vol. V, parts A and B, New York, Dordrecht, Heidelberg, London. 2083p.
- Norrby S. R., Nord C. E. and Finch R. (2005).** Lack of development of new antimicrobial drugs: a potential serious threat to public health. *Lancet. Infect. Dis.* **5** :115-119.
- Ohta N., Park Y.S., Yahiro K. et Okabe M. (1995).** Comparaison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J. Ferment. Bioeng.* **79** (5): 443-448.
- Pagés, J.M. and Garnotel.E. (2003).** Perméabilité membranaire et résistance aux antibiotiques chez les bactéries à gram négatif. *Rev. Fr. Lab.*, **2003**: 57–63.
- Pandey A., Shukla A. and Majumdar S.K. (2005).** Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an Antibacterial antibiotic. *African J. Biotech.*, **4**: 909-910.
- Paquet V. (1990).** Mise en évidence de facteurs d'induction de la production de pristinamycines chez *Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de doctorat, INSA, Toulouse, France.
- Park Y.S., Momose I., Tsunoda K. and Okabe M. (1994).** Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol Biotechnol.* **40**: 773-779.

- Patel J.J. and Brown. M.N. (1969).** Interaction of azotobacter with rhizosphere and root surface microflora. *Plant and soil*. **31**:271-281.
- Paudel S., Lee H.C., Kim B.S. and Sohng JK. (2011).** Enhancement of pradimicin production in *Actinomyces* P157-2 by metabolic engineering. [Microbiol Res.](#) **167**(1):32-9.
- Pirouz T., Karbasian M. A. and Goodfellow M. (1999).** Isolation of some aerobic actinomycetes species. *Iran. J. Med. Sci.* **24**: 65-67.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg C.M., Dusart J. (2002).** *Microbiologie*. De Boeck Université. 1147 p.
- Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., Bacq-Calberg CM. and Dusart.J. (2002).** *Microbiologie*. De Boeck Université. 1147p.
- Prescott LM., Harley JP., Klein DA. (2007).** *Microbiologie*. De Boeck and Larcier, Bruxelles. pp.805-825.
- Promnuan Y., Kudo T., Ohkuma M., and Panuwan C. (2011).** *Actinomyces* sp. nov., isolated from a honey bee (*Apis mellifera*) hive, and the reclassification of *Actinomyces cremea* subsp. *rifamycinii* Gauze *et al.* 1987 as *Actinomyces rifamycinii* (Gauze *et al.* 1987) sp. nov., comb. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**: 2271-2277.
- Puhl A.A., Selinger L.B., McAllister T. A. and G. D Inglis. (2009).** *Actinomyces keratinilytica* sp. nov., a keratin-degrading actinobacterium isolated from bovine manure compost. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 828-834.
- Qin S., Zhao G. Z., Li J., Zhu W. Y., Xu L. H. and Li W. J. (2009).** *Actinomyces flavalba* sp. nov., an endophytic actinomycete isolated from leaves of *Maytenus austroyunnanensis*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**:2453-2457.
- Quintana E.T., Trujillo M.E. and Goodfellow M. (2003).** *Actinomyces mexicana* sp. nov. and *Actinomyces meyerii* sp. nov., two novel soil sporoactinomycetes. *System. Appl. Microbiol.* **26** (4): 511-517.
- Saitoh K., Susuki K., Hirano M., Furumai T. and Oki T. (1993).** Pradimicins FS and FB, new pradimicin analogs: directed production, structures and biological activities. *J. Antibiot.*, **46**: 398-405.
- Sato A., Ogawa A. H. and Satomura Y. (1976).** Regulation of N-acetylkanamycin amidohydrolase in the idiophase in kanamycin fermentation. *Agr. Biol. Chem.*, **40**: 191-196.
- Shimizu K. (2013).** Metabolic Regulation of a Bacterial Cell System with Emphasis on *Escherichia coli* Metabolism. *ISRN Biochem.* 47 p
- Shivlata L. and Satyanarayana T. (2015).** Thermophilic and alkaliphilic Actinobacteria: biology and potential Application. *Front. Microbiol.* **6** (1014) :1-29

- Sivakumar K., Sahu M.K., Thangaradjou T. and Kannan L. (2007).** Research on marine actinobacteria in India. *Indian J. Microbiol.* **47**:186-196.
- Smaoui (2010).** Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat, Université de Toulouse, 181p.
- Smith, G.M., Calam, C.T. (1980).** Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.* **2**: 261- 266.
- Solanki R. and Khanna M. (2008).** Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* **48**: 410-431.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.*, **7**:373-390.
- SpiZek J., Tichjl P. (1995).** Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Folia Microbiol.* **40**, 43-50.
- Stora D. (2013).** Pharmacologie et thérapeutique. 2e édition - Editions Lamarre. France. 240 p
- Subramani R. Aalbersberg W. (2012)** Marine actinomycetes: An ongoing source of novel bioactive metabolites. *Microbiological Research.* **167**:571-580
- Takahashi Y. and Omura S. (2003).** Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **49**(3) :141-154.
- Takeuchi M., Takahashi S., Enokita R., Sakaida Y., Haruyama H., Nakamura T., Katayama T. and Inukai M. (1992).** Galacardines A and B, new glycopeptide antibiotics. *J. Antibiot.*, **45** (10): 297-305.
- Tamura S., Park Y., Toriyama M. et Okabe M. (1997).** Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng.*, **83** (6): 523-528.
- Tiwari K. and Gupta R. K. (2012).** Rare actinomycetes: a potential storehouse for novel antibiotics. *Critical Reviews in Biotechnology.* **32**(2): 108-132.
- Toumatia O. (2010).** Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. P 115.
- Toumatia, O. (2015).** Étude de quelques souches de *Streptomyces* des sols arides d'Algérie antagonistes de *Fusarium culmorum*: taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre la fusariose du blé. Thèse de doctorat. École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Alger. P 266.
- Tseng M., Yang S.F., Hoang K.C., Liao H.C., Yuan G.F. and C.C. Liao. (2009).** *Actinomadura miaoliensis* sp. nov., a thermotolerant polyester-degrading actinomycete. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*, **59**:517-520.

- Van de Sande W.W. (2013).** Global burden of human mycetoma: A systematic review and metaanalysis. *Plos. Negl. Trop. Dis.* **7**:2550.
- Vastrad B.M. and Nelagund S.E. (2011).** Optimization and production of neomycin from different agro industrial wates in solid state fermentation, *IJPSDR.*, **3**: 104-111.
- Velayudham S. and Murugan K. (2012).** Diversity and Antibacterial Screening of Actinomycetes from Javadi Hill Forest Soil, Tamilnadu, India. *J .Microbiol. Res.* **2**(2): 41-46.
- Vertesy L., Barbone F., Cashmen E., Decker H., Ehrlich K., Jordan B., Knauf M., Schummer D., Segeth M., Wink J. and Seibert G. (2001).** Pluraflavins, potent antitumor antibiotics from *Saccharothrix* sp. DSM 12931. *J. Antibiot.*, **54**: 718-29.
- Veziris N., Chauffour A., Escolano S., Henquet S., Matsuoka M., Jarlier V. and Aubry A. (2013).** Resistance of *M. leprae* to Quinolones: A Question of Relativity?. *Plos. Negl. Trop. Dis.* **7**:e2559.
- Vilches C., Mendez C., Hardisson C. and Salas J.A. (1990).** Biosynthesis of oleandomycin by *Streptomyces antibioticus*: influence of nutritional conditions and development of resistance. *J. Gen. Microbiol.*, **136**: 1447-1454.
- Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H. and Gao X. (2010).** Optimisation of the fermentation Process of actinomycete *Saccharothrix xinjianjiagensis*. *Tetraherdron.* **69**: 6060-6064.
- Ward A.C. and Bora N. (2006).** Diversity and biogeography of marine actinobacteria. *Curr. Opin.Microbiol.* **9**:279-86.
- Wellington E.M. and Ul-Hassan A. (2009).** Actinobacteria. *Encyclopedia of Microbiology* (Moselio Schaechter, Ed.), pp. 26-44, Oxford: Elsevier.
- Whitaker, A. and Long, P.A. (1973).** Fungal pelle ting. *Process Bioc hem.* **8**: 27-31.
- Wink J., Kroppenstedt R.M., Seibert G. and Stackebrandt E. (2003).** *Actinomadura namibiensis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **53** :721-724.
- Yala D., Merad A. S., Mohamedi D. et Ouar Korichand M.N. (2001).** Classification et mode d'action des antibiotiques. *Médecine du Maghreb.* **91**: 5-12.
- Yoneyama H. and Katsumata R. (2006).** Antibiotic Resistance in Bacteria and its Future for Novel Antibiotic Developpement. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **70** (5) :1060-1075.
- Zaitlin B. and Watson S.B. (2006).** Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res.* **40**:1741-1753.
- Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T. and Parkinson D. (2003).** Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res. J. Can.* **95**:113-118.

- Zeng X., Wang S., Jing K., Zhang Z. and Lu Y. (2013).** Use of biodiesel-derived crude glycerol for vancomycin production by *Amycolatopsis orientalis* XMU-VS01. Eng. Life Sci., 13, No. 1: 109-116.
- Zhu C.H., Lu F.P., He Y.N., Han Z.L. And Du L.X. (2007).** Regulation of ilamycin biosynthesis in *Streptomyces viridochromogenes*: effect of glucose, ammonium ion and inorganic phosphate. Appl. Microbiol. Biotechnol., **73**: 1031-1038.
- Zitouni A. (2005).** Taxonomie et antibiotiques des Saccharothrix et des Nocardioopsis des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. p 230.

Annexe

Les milieux de culture

1. Milieu Mueller-Hinton

- Extrait de viande 3g ;
- Hydrolysate de caséine 17,5g ;
- Amidon 1,5g ;
- Agar 12g ;
- Eau distillée 1000 mL ;
- pH 7,4.

2. Milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966)

- Glucose 4g ;
- Extrait de levure 4g ;
- Extrait de malt 10g ;
- Agar 18 g ;
- Eau distillée 1000 mL ;
- pH 7,4.

3. Milieu MS (Bouras *et al.*, 2006)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g;
- NaCl 2 g ;
- KH_2PO_4 0,5 g;
- K_2HPO_4 1 g ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g;
- CaCO_3 2g ;
- Eau distillée 1000 ml ;
- pH 7.

4. Milieu MSS (Bouras *et al.*, 2006)

- $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 2g
- NaCl 2 g ;
- KH_2PO_4 0,5 g;
- K_2HPO_4 1 g ;
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g;
- CaCO_3 2g ;
- Extrait de levure 2g ;
- Eau distillée 1000 ml ;
- pH 7.

5. Milieu PDA (Rapilly, 1968)

- Filtrat de pomme de terre: 500 ml (le filtrat est préparé en mettant à bouillir 200 à 250 g de pomme de terre épluchée dans 500 ml d'eau distillée);
- glucose: 20 g;
- agar: 20 g;
- eau distillée: 500 ml;
- pH 6,5.

Introduction

Synthèse bibliographique

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion et perspectives

Annexe

Références bibliographiques