

**République Algérienne Démocratique et Populaire**

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



**Université de BLIDA 1**



**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**

**Département de Biologie et Physiologie Cellulaire**

**MEMOIRE DE FIN D'ETUDE**

**En vue de l'obtention du diplôme Master**

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

**Filière: Sciences biologiques**

**Spécialité: Microbiologie – bactériologie**

**Thème:**

**Etude de l'activité antimicrobienne de quelques  
souches de *Planomonospora* sp. contre  
*Staphylococcus aureus* résistant a la méthicilline.**

Présenté par:

**ALLAM Soumia**

et

**BOUKERRIT Fatima**

Soutenu le : 16 / 09 / 2015

Devant le jury composé de:

<b>Mme. AIT SAADI N.</b>	<b>M.A.A</b>	<b>Université de BLIDA</b>	<b>Présidente</b>
<b>Mme. DEBIB A.</b>	<b>M.C.B</b>	<b>Université de BLIDA</b>	<b>Examinatrice</b>
<b>Mr. MOKRANE S.</b>	<b>M.C.A</b>	<b>ENS de Kouba, Alger</b>	<b>Promoteur</b>

**Année universitaire : 2014/2015**

# Remerciements

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de L'École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, sous la direction du professeur SABAOU Nasseridine, en une durée de quatre mois allant du 15 février au 15 juin 2015. Nous tenons à lui exprimer toute notre gratitude pour nous avoir donné la chance de préparer ce mémoire et nous avoir initiés à la recherche et pour ses précieux conseils.*

*Nous remercions notre promoteur Docteur MOKRANE Salim, Maître de Conférence A à l'ENS de Kouba de nous avoir encadrées, formées, et dirigées pendant la durée de ce mémoire et surtout de nous avoir fait confiance. Qu'il trouve ici toute notre gratitude.*

*Nous remercions particulièrement, Mademoiselle CHAABANE CHAOUCH Fouzia, (ENS de Kouba) pour ses encouragements, ses remarques pertinentes et ses conseils en or, qui nous ont beaucoup aidés pour réaliser ce travail.*

*Nous témoignons notre reconnaissance à Madame AITSAADI Nacéra, Maître Assistante A à l'Université Saâd Dahleb de Blida, pour l'honneur qu'elle nous fait de présider le jury.*

*Nous remercions profondément Madame DEBIB Aicha, Maître de Conférence B à l'Université Saâd Dahleb de Blida, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Nous exprimons toute notre gratitude et nos remerciements à Madame MEKLAT Atika, Maître de Conférence A à l'Université Saâd Dahleb de Blida pour son aide, ses encouragements et son soutien.*

*Etant donné qu'un travail de recherche ne se fait jamais seul, nous tenons à remercier chaleureusement l'ensemble des membres du LBSM de l'ENS de Kouba, en particulier Monsieur Belaoui Hadj Ahmed, Madame Boudjella Hadjira, Madame Kaci sonia et Monsieur Toumatia Omrane.*

*Nous exprimons également nos remerciements et notre reconnaissance à tous nos enseignants, du cycle primaire jusqu'au cycle universitaire.*

*Nous voudrions exprimer nos remerciements à toute personne que nous avons oublié de citer et qui aurait aidé ou contribué à la réalisation de ce mémoire.*



## Dédicaces

*Je dédie ce travail :*

*A mes très chers parents que dieu me les garde,  
j'espère que ce mémoire soit pour eux un  
remerciement suffisant pour leurs aides, leurs  
conseils et leur soutien moral et matériel tout au  
long de mes études.*

*A mes très chers frères Djamel, Zoubir, Kamel,  
Adel, je dois mon éducation, et ma réussite.*

*A mes sœurs surtout Wassila*

*A mes neveux et nièces surtout Mohamed,  
Housseem, Adem, Souhaib, Zakaria, Khadidja et  
Tadje elddine.*

*A ma famille et mes amies.*

*Soumia*



## *Dédicaces*

*Je souhaite dédier ce modeste travail, synonyme de concrétisation de tous mes efforts fournis ces dernières années :*

*A mes très chers parents, ma raison de vivre, symbole de courage et de sacrifice, que dieu les garde.*

*A mes chers frères : Abdelbaqui, Abdelaziz, Abdelmalek et Abdelali.*

*A mes très chères sœurs : Soraya, Naziha, Faiza et Zahra.*

*A mes oncles et mes tantes.*

*A toute la famille BOUKERRIT*

*A mes amis : Khadidja, Wissam, Soumia, Hamida, Afaf et Kauther.*

*Fatima.*



**TABLE DES MATIERES**

<b>REMERCIEMENTS</b>	<b>Page</b>
<b>DEDICACES</b>	
<b>TABLE DES MATIERES</b>	
<b>RESUME</b>	
<b>ABSTRACT</b>	
<b>ملخص</b>	
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	
<b>LISTE DES FIGURES</b>	
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	
<b>INTRODUCTION</b>	<b>1</b>
<b>PARTIE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. LES ACTINOBACTERIES, TAXONOMIE, ECOLOGIE ET DOMAINES D'INTERETS</b>	<b>3</b>
1. Caractéristiques générales des actinobactéries	3
2. Taxonomie générale des actinobactéries	3
2.1. Détermination des actinobactéries	3
2.1.1. Critères Morphologiques	3
2.1.1.1. Critères Macromorphologiques	4
2.1.1.2. Critères Micromorphologiques	4
2.1.2. Critères Chimiotaxonomiques	4
2.1.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique	4
2.1.4. Critères Moléculaires	5
2.1.4.2. Pourcentage en guanine – cytosine	5
2.1.4.1. Analyse des séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S	5
2.1.4.3. Hybridation ADN-ADN	5
3. Le Genre <i>Planomonospora</i>	7
3.1. Généralité sur le genre <i>Planomonospora</i>	7
3.2. Taxonomie supragénérique du genre <i>Planomonospora</i>	7
3.2.1. Espèces appartenant au genre <i>Planomonospora</i>	7
4. Ecologie des actinobactéries	9

## Table des matières

---

4.1. Distribution dans la nature	9
4.2. Distribution dans les sols sahariens algériens	10
4.3. Distribution de genre <i>Planomonospora</i> et techniques d'isolement	10
5. Importance des actinobactéries	10
5.1. Dans le domaine pharmaceutique et médical	10
5.2. Dans le domaine agronomique	11
5.3. Dans les divers d'autres domaines	11
<b>II. <i>Staphylococcus aureus</i> ET RESISTANCE A LA</b>	
<b>METHICILLINE</b>	11
1. Antibiotiques	11
1.1. Généralités	11
1.2. Classification des antibiotiques	12
1.2.1. Classification selon leur structure chimique	12
1.2.2. Autres critères de classification	12
1.3. Les $\beta$ - lactamines	14
1.3.1. La méthicilline	14
1.3.2. Mécanisme d'action des $\beta$ - lactamines	14
1.4. Métabolites secondaires secrétés par le genre <i>Planomonospora</i>	15
2. Le germe <i>Staphylococcus aureus</i>	15
2.1. Généralités	15
2.1.1. Caractères bactériologiques	15
2.1.2. Taxonomie	16
2.2. Facteurs de virulence et physiopathologie	16
2.3. Infections due par <i>Staphylococcus aureus</i>	17
2.4. Mécanisme de résistance à la méthicilline	17
<b>PARTIE II: MATERIEL ET METHODES</b>	
<b>I. MATERIEL BIOLOGIQUES</b>	20
1. Souches d'actinobactéries et germes cibles	20
1.1. Souches de genre <i>Planomonospora</i>	20
1.1.1. Position taxonomique des souches de genre <i>Planomonospora</i>	20
1.2. Microorganismes-cibles	21

<b>II. METHODES</b>	<b>21</b>
<b>ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DU GENRE <i>Planomonospora</i></b>	
1. Mise en évidence de L'activité antagoniste des souches de genre <i>Planomonospora</i> sur milieu solide (cylindres d'agar)	<b>21</b>
1.1. Préparation et calibration des suspensions bactériennes	<b>21</b>
1.2. Test de l'activité antagoniste	<b>21</b>
2. Croissance et production des composés antibactériens en milieu liquide par les souches de <i>Planomonospora</i>	<b>22</b>
2.1. Milieu de culture	<b>22</b>
2.2. Pré- cultures	<b>22</b>
2.3. Cinétiques de croissance et de production des composés antibactériens	<b>23</b>
2.3.1. Evolution de l'activité des composés antibactériens	<b>23</b>
2.3.2. Mesure de poids sec	<b>23</b>
2.3.3. Mesure de pH	<b>23</b>
3. Extraction des composés antibactériens et antibiographie	<b>24</b>
3.1. Extraction à partir des filtrats de culture	<b>24</b>
3.2. Extraction à partir du mycélium	<b>24</b>
3.3. Antibiographie	<b>25</b>
4. Purification des molécules antibactériennes par HPLC	<b>27</b>
5. Etude da la stabilité de l'activité antibactérienne à la température	<b>27</b>
 <b>PARTIE III: RESULTATS ET DISCUSSION</b>	
<b>I. Etude des propriétés antagonistes des souches de genre <i>Planomonospora</i></b>	<b>28</b>
1. Mise en évidence de l'activité antagoniste en milieu solide (cylindres d'agar)	<b>28</b>
<b>II. Production de molécules antibactériennes en milieu liquide</b>	<b>32</b>
1. Cinétiques de production des composés antibactériens, de croissance et de pH des deux souches <i>Planomonospora</i> sp. Pm1 et	<b>32</b>



## Table des matières

---

*Planomonospora* sp. Pm11

### **III. Extraction des composés antibactériens et antibiographie** 39

#### 1. Extraction des composés antibactériens par les deux souches: 39

*Planomonospora* sp. Pm1 et *Planomonospora* sp. Pm11

##### 1.1. Extraction à partir du filtrat de culture 39

##### 1.2. Extraction à partir du mycélium 39

### **IV. Purification des molécules antibactériennes de la souche** 41

*Planomonospora* sp. Pm11 par HPLC

#### 1. Analyse par HPLC des extraits organiques du filtrat de culture 41

#### 2. Analyse par HPLC de l'extrait méthanolique du mycélium 43

#### 3. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne à la température 44

### **CONCLUSION ET PERSPECTIVES** 46

### **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

### **ANNEXES**

## RESUME

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les activités antibactériennes de quelques souches d'actinobactéries provenant de différents sols Sahariens d'Algérie (Adrar, Béchar et Hoggar) et appartenant au genre *Planomonospora* qui est connu pour être rare dans le monde. Et de sélectionner les meilleures souches pour l'étude des activités antibactériennes en milieu liquide et de purifier les molécules antibactériennes sécrétées par ces souches.

Au total, 17 souches appartenant au genre *Planomonospora* ont été isolées sur le milieu Chitine –vitamines-B agar (Ch-VB) en utilisant des agents antimicrobiens, ces souches ont fait l'objet d'une étude préliminaire de leurs propriétés antagonistes.

L'activité antibactérienne des souches a été évaluée contre quatre des germes cibles de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline sur deux milieux solides, Bennett et « Hickey-Tresner-Agar » (HTA), en effet 12 souches ont montré une activité moyenne à forte contre les germes cibles. Cette étude a permis de sélectionner deux souches de *Planomonospora* ayant montré une forte activité antibactérienne, désignées Pm1 et Pm11, pour une étude approfondie de leurs composés antibactériens. Les résultats obtenus de l'activité antagoniste ont montré que le milieu Bennett est meilleur pour la production des substances antibactériennes.

Une cinétique de croissance et de production des molécules antibactériennes effectuée sur le milieu complexe liquide Bennett pendant 10 jours, a permis de déterminer le jour de production optimale de chaque souche (4<sup>ème</sup> jour pour Pm1 et 3<sup>ème</sup> jour pour Pm11). Les antibiotiques ont été extraits par quatre solvants organiques et les meilleurs solvants d'extraction (Acétate d'éthyle et dichlorométhane) ont été déterminés par antibiographie.

La purification des extraits obtenus par HPLC a montré la présence de cinq molécules bioactifs.

**Mots clés:** Actinobactéries, *Planomonospora*, propriétés antagonistes, cinétiques, substances antibactériennes, Antibiographie, sols Sahariens.

## ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of some isolated actinobacterial strains from different Saharan soils of Algeria (Adrar, Béchar, and Hoggar) belonging to the genus *Planomonospora* which is described as rare in the world.

A total of 17 strains belonging to the genus *Planomonospora* were isolated by using the selective medium chitin vitamins agar (Ch-V), and subjected to a preliminary study for their antagonistic properties.

The antibacterial activity of our isolates was evaluated against 4 strains of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). For this purpose, two solid medium, Bennett and Hickey-Tresner-Agar (HTA) were used. The 12 tested *Planomonospora* strains, showed moderate to strong activities against target microorganisms.

The obtained results allowed the selection of two strains (Pm1 and Pm11) showing the highest antibacterial activity. These strains were subjected to further detailed studies, such as the kinetics of the production of antibacterial substances.

The liquid medium Bennett showed better results in regards to the production antimicrobial substances when compared with HTA.

The kinetics of microbial growth and the production of antibacterial compounds on Bennett liquid medium during 10 days of incubation, have allowed the determination of the day of optimum production for each strain (4<sup>th</sup> day for Pm1 and 3<sup>rd</sup> day for Pm11). The antibacterial substances were extracted using 4 organic solvents; antibiography tests showed that ethyl acetate and dichloromethane were the best.

The extracts were analyzed by HPLC, data analysis of the obtained chromatographic profiles allowed us to predict the presence of at least 5 different antibacterial substances which were produced by the selected strain Pm11.

**Key words:** Actinobacteria, *Planomonospora*, antagonistic properties, kinetics, antibacterial substances, antibiography, Saharan soils.

## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط ضد البكتيري لبعض السلالات من الأكتينوبكتيريا (Actinobactéries) المعزولة من أترربة من مناطق صحراوية مختلفة في الجزائر (أدرار، بشار والهقار) والمنتمية للجنس *Planomonospora* المعروف بكونه من الأجناس النادرة في العالم. هذا بالإضافة إلى اختيار أفضل السلالات من أجل دراسة نشاطها ضد البكتيري في وسط سائل وتنقية المركبات ذات النشاط ضد البكتيري المنتجة من طرف هذه السلالات.

تم عزل 17 سلالة منتمية للجنس *Planomonospora* باستعمال الوسط « Chitine-vitamine-B agar » مدعم بعوامل العزل الانتقائي. كانت هذه السلالات محل دراسة أولية لتقدير خصائصها التضادية.

درست الفعالية ضد بكتيرية للسلالات قيد الدراسة اتجاه أربع سلالات من المكورات الذهبية المقاومة للمثسليين (*Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, MRSA) وذلك باستخدام الوسطين الصليبين Bennett و (HTA) « Hickey-Trenser-Agar » .

أظهرت اثنا عشرة سلالة نشاطا متوسطا إلى قوي اتجاه البكتيريا المستهدفة، مما سمح باختيار سلالتين من الـ *Planomonospora* (Pm1 و Pm11) من أجل دراسات معمقة لاحقة، مثل دراسة حركات النمو وإنتاج المضادات الحيوية. أظهرت الدراسات المتعلقة بإنتاج المركبات المضادة للبكتيريا تفوق الوسط Bennett على الوسط HTA.

سمحت دراسة حركات النمو وإنتاج الجزيئات ذات النشاط ضد البكتيري على الوسط السائل Bennett ولمدة 10 أيام، من تحديد اليوم الأمثل للإنتاج لكل سلالة (اليوم الرابع للسلالة Pm1 واليوم الثالث للسلالة Pm11).

استخلصت المركبات ذات النشاط ضد البكتيري باستعمال أربع مذيبات عضوية، حيث مكّنت نتائج الدراسة المتعلقة بالكشف التضادي (Antibiographie) من اختيار المذيبين العضويين خلاص الإثيل وثنائي كلور الميثان (Acétate d'éthyle, dichlorométhane) كأحسن مذيبين استخلاص ضمن هذه الدراسة.

أوضحت نتائج التنقية بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) للمستخلصات المحصل عليها، وجود ما لا يقل عن خمس مركبات ذات نشاط ضد بكتيري والتي يتم إفرازها من قبل السلالة قيد الدراسة Pm11.

**كلمات مفتاحية:** الأكتينوبكتيريا، *Planomonospora*، الخصائص التضادية، حركات النمو والإنتاج، مركبات ذات نشاط ضد البكتيري، الكشف التضادي، أترربة صحراوية.

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

- ADN:** Acide désoxyribonucléique
- ARNr:** Acide ribonucléique ribosomique
- ATCC:** American Type Culture Collection
- BORSA:** Borderline Resistant *Staphylococcus aureus*
- Ch.VB:** Chitine-vitamines B-agar
- DAP:** Diaminopimelic acid
- G+C%:** pourcentage en Guanine + Cytosine
- GISA:** Glycopeptide Intermediate-Sensitive *Staphylococcus aureus*
- GN:** Gélose nutritive
- h:** Heure
- HPLC:** High Performance Liquid Chromatography
- HTA:** Milieu Hickey-Tresner-Agar
- ISP:** International *Streptomyces* Project
- LBSM:** Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens
- MA:** Mycélium aérien
- MeOH:** Méthanol
- MecA:** Methicillin resistant gene
- MK:** Ménaquinones
- mL:** millilitre
- mm:** millimètre
- MODSA:** Modified Penicillin-Binding Protein
- MS:** Mycélium de substrat
- P.:** *Planomonospora*
- PCR:** Polymerase Chain Reaction
- PL:** Phospholipide
- PGPR:** Plant Growth Promoting Rhizobacteria
- PLP:** protéine liant la pénicilline
- rpm:** rotations par minute
- S. aureus:** *Staphylococcus aureus*
- SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline
- SASM:** *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline
- SCCmec:** Staphylococcal cassette chromosome mec
- µL:** microlitre
- µm:** micromètre
- °C:** Degré Celsius

## LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1. Micromorphologie de quelques genres d'actinobactéries.	6
Figure 2. Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les espèces du genre <i>Planomonospora</i> , établi sur la base de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S.	8
Figure 3. Micromorphologie de quelques espèces d'actinobactéries appartenant au genre <i>Planomonospora</i> vues au microscope électronique à balayage.	9
Figure 4. Structure chimique de la méthicilline.	14
Figure 5. (1) Colonies de <i>Staphylococcus aureus</i> sur une gélose de Chapman, (2) Aspects caractéristiques en amas de coques à gram positif de <i>Staphylococcus aureus</i> .	16
Figure 6. Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par <i>Staphylococcus aureus</i> .	19
Figure 7. La méthode de cylindre d'agar.	22
Figure 8. Protocole général de production, d'extraction et de purification des composés antibactériens des souches d'actinobactéries sélectionnées.	26
Figure 9. Activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar de quelques souches de <i>Planomonospora</i> , cultivées pendant 12 jours à 30 °C sur les milieux solides HTA (H) et Bennett (B).	28
Figure 10. Histogramme montre l'activité des souches de <i>Planomonospora</i> sur les deux milieux testés: Bennett et HTA.	30
Figure 11. L'activité antagoniste des souches Pm1 et Pm11 par la méthode des cylindres d'agar contre des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline: MRSA 639c, MRSA 3, <i>S. aureus</i> ATCC 43300 et <i>S. aureus</i> ATCC 29213 sur les deux milieux solides Bennet (B) et HTA (H).	31
Figure 12. Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche Pm1 par la méthode des puits contre les souches SARM (MRSA 639c, <i>S.aureus</i> ATCC 29213 et <i>S.aureus</i> ATCC 43300) du jour 1 (J1) au jour 10 (J10).	33
Figure 13. Cinétiques de l'évolution du pH, de la croissance et de l'activité antibactérienne de la souche Pm1 dans le milieu Bennett, contre des souches <i>Staphylococcus aureus</i> résistant à la méthicilline (MRSA 639c, <i>S.aureus</i> ATCC 43300 et <i>S.aureus</i> ATCC 29213).	34

- Figure 14.** Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche Pm11 par la méthode des puits contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA 639c, *S.aureus* ATCC 29213 et *S.aureus* ATCC 43300) du jour 1 (J1) au jour 10 (J10). 36
- Figure 15.** Cinétiques de l'évolution du pH, de la croissance et de l'activité antibactérienne de la souche Pm11 dans le milieu Bennett, contre *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline (MRSA 639c, *S.aureus* ATCC 43300 et *S.aureus* ATCC 29213). 37
- Figure 16.** Résultats des tests d'activité par antibiographie des différents extraits des deux souches Pm1 et Pm11, contre la souche MRSA 639c. **Note :** H., *n*-hexane; D., dichlorométhane ; A., acétate d'éthyle ; B., *n*-butanol ; M., mycélium ; E., phase aqueuse de *n*-butanol (après une double extraction). Le diamètre du disque (6 mm) est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition. 40
- Figure 17.** Profils chromatographiques des extraits organiques du filtrat de culture de la souche Pm11 solubilisé dans du méthanol (colonne waters C18, gradient méthanol-eau. débit: 1 mL/min; détection: 220 nm). (A): extrait au dichlorométhane; (B): extrait à l'hexane; (C): extrait à l'acétate d'éthyle; (D): extrait au *n*-butanol. 42
- Figure 18.** Test d'activité par antibiographie des fractions issues de l'analyse par HPLC de l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de la souche pm11 (fractions des pics 1, 2, 3, 4, 5 et 6 ) contre la souche MRSA 639c. 43
- Figure 19.** Profil du chromatogramme de l'extrait méthanolique du mycélium de la souche Pm11 solubilisé dans du méthanol (colonne waters C18, gradient méthanol-eau. débit: 1 mL/min; détection: 220 nm). 44
- Figure 20.** Profil chromatographique de l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de la souche Pm11 après traitement à chaleur humide (120 °C pendant 20 min; conditions HPLC: colonne waters C18, gradient méthanol-eau. débit: 1 mL/min; détection: 220 nm). 44

## LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1. Classification des antibiotiques selon leur structure chimique.	13
Tableau 2. Les métabolites secondaires secrétés par les espèces de genre <i>Planomonospora</i> .	15
Tableau 3. Les principaux facteurs de pathogénicité produit par <i>Staphylococcus aureus</i> .	17
Tableau 4. Données sur les souches utilisées.	20
Tableau 5. Activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar des souches du genre <i>Planomonospora</i> sur les deux milieux solides HTA et Bennett.	29
Tableau 6. Résultats des tests d'activité par antibiographie pour les deux souches Pm1 et Pm11 contre la souche MRSA 639c des extraits organiques, de la phase aqueuse et du mycélium, les chiffres correspondent aux zones d'inhibitions en mm.	40
Tableau 7. Activité antibactérienne des fractions issues de l'analyse par HPLC de l'extrait au dichlorométhane contre la souche MRSA 639c.	43



# **INTRODUCTION**

L'utilisation des antibiotiques a largement contribué à améliorer la santé des populations durant ces 60 dernières années, cependant leur utilisation intensive, excessive et inopportune a conduit à l'évolution des bactéries vers la multi-résistance aux antibiotiques, l'émergence et la réémergence des maladies infectieuses et l'augmentation de l'incidence et de la sévérité des infections nosocomiales et iatrogéniques qui pose aujourd'hui de vrais problèmes de santé publique dans le monde. En effet, [Cassell et Mekalanos, \(2001\)](#) ont estimé que le coût annuel de la résistance antimicrobienne dans les hôpitaux est estimé à 4,5 milliards de dollars et dont 122 millions de dollars uniquement pour *Staphylococcus aureus*.

Les actinobactéries sont des bactéries à Gram positif dont la plupart sont mycéliennes, et sont connues pour être ubiquitaires. En effet, ces microorganismes sont isolés à partir des déserts chauds, des eaux et des sédiments, des lacs riches en soude, des sites pollués par des hydrocarbures et des métaux lourds, etc., avec toutefois une nette préférence pour les sols ([Goodfellow et Williams, 1983](#); [Khamna et al., 2009](#)). Ces bactéries représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement un nombre considérable d'enzymes, de composés antitumoraux, d'agents immunosuppresseurs, d'insecticides, d'antiparasites, d'herbicides, et surtout d'antibiotiques ([Solanki et al., 2008](#)).

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des antibiotiques utilisés en médecine ([Sujatha et al., 2005](#); [Smaoui, 2010](#)). Mais, Actuellement le genre *Streptomyces* est largement étudié et exploité, et parmi ces métabolites découvertes, nombreux sont des analogues de molécules déjà connues, des composés n'ayant pas d'activité antibiotique ou encore des composés mineurs ([Berdy, 2005](#)).

L'exploration de nouveaux sols et habitats est fortement recommandée pour la recherche de microorganismes rares, souvent difficile à isoler. Ce type de microorganisme est préconisé pour la production de nouveaux antibiotiques ([Nolan et Cross, 1988](#); [Baltz, 2006](#)). Dans ce contexte, les sols sahariens d'Algérie constituent un milieu extrême, à un climat aride à subhumide et reconnus par une très grande biodiversité en actinobactéries. des plus fréquents comme (*Streptomyces*) aux moins fréquents ou même parfois rares, tels que *Actinomadura*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc. ([Boudjella, 1994](#); [Sabaou et al., 1998](#)).

## [Tapez le titre du document]

---

Vu les considérations ci-dessus, la solution à long terme pour contrer les résistances microbiennes est de développer ou rechercher de nouvelles molécules antimicrobiennes, que ce soit par:

- ✓ Synthèse de nouvelles molécules et/ou hémi-synthèse à partir de structures connues.
- ✓ Exploiter les populations microbiennes non cultivables par le concept de métagénomique (Peric- Concha et Long, 2003).
- ✓ Isolement de nouvelles espèces bactériennes ou fongiques à partir d'écosystèmes peu ou pas explorés, et l'analyse de leurs produits de fermentation.

Pour notre part, nous nous sommes fixés comme objectif d'évaluer les propriétés antagonistes des souches du genre *Planomonospora* contre des microorganismes pathogènes pour l'homme, et de sélectionner les meilleures souches pour l'étude des activités antibactériennes en milieu liquide et de purifier les antibiotiques sécrétés par ces dernières.

Ce travail est réparti en trois parties:

- ❖ La première partie est consacrée à une présentation bibliographique, concernant les actinobactéries en général et le genre *Planomonospora* en particulier. Les antibiotiques et les mécanismes de la résistance de *Staphylococcus aureus* à la méthicilline.
- ❖ La deuxième partie est relative à la description du matériel et des méthodes utilisées.
- ❖ Dans la troisième partie, les résultats sont présentés et discutés. Ils concernent la mise en évidence de l'activité antagoniste des souches d'actinobactéries contre les microorganismes-cibles en vue de sélectionner les meilleures souches. Celles-ci ont fait l'objet d'une étude des substances antibactériennes qu'elles sécrètent, du point de vue production (cinétiques), extraction, purification.

Une conclusion faisant le bilan de notre travail est également énoncée.

# **ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

### I. LES ACTINOBACTERIES, TAXONOMIE, ECOLOGIE ET DOMAINES D'INTERETS

#### 1. Caractéristiques générales des actinobactéries

Les actinobactéries étaient connues depuis longtemps sous le terme d'« actinomycètes », ce terme qui signifie (champignons rayonnant) est dérivé du mot grec *Aktino* qui signifie rayons et *Mycètes* qui signifie champignons, dont la croissance donne lieu à des colonies circulaires constituées de filament qui irradient par croissance et centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Waksman et Henrici, 1943; Kutzner, 1981; Larpent et Sanglier, 1989; Holt *et al.*, 1994), ce sont des bactéries filamenteuses et ramifiées à gram positive (Williams *et al.*, 1993; Sanglier et Trujillo, 1997) dont le coefficient de Chargaff ( pourcentage en G+C) est supérieur à 55 % (Ensign, 1978; Larpent et Sanglier, 1989; Chun *et al.*, 1997), formant des colonies à morphologie complexe (Colombié, 2005), Ils comprennent des formes peu évoluées comme le genre *Mycobacterium* (bâtonnets ou rarement mycélium rudimentaire), ou très évoluées, comme le genre *Streptomyces* qui forme un véritable mycélium non fragmenté (Tighidet, 2011). Leur croissance est plus lente que celle des autres bactéries avec un temps de génération moyen d'environ 2 à 3 heures (Ottow et Glathe, 1968; Larpent et Sanglier, 1989).

Les actinobactéries sont des hétérotrophes, mais plusieurs espèces sont aussi chimioautotrophes (Ensign *et al.*, 1993), qui préfèrent un pH neutre ou peu alcalin, la plupart sont mésophiles d'autres sont thermophiles (50 à 60 °C) (Omura, 1992).

Physiologiquement, il est possible de distinguer les formes aérobies qui sont de très loin les plus nombreuses, et des formes anaérobies trouvés primitivement chez les animaux et l'homme (Omura, 1992; Boucheffa, 2011).

#### 2. Taxonomie générale des actinobactéries

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires. Les critères morphologiques et chimiques permettent d'identifier les genres tandis que les critères physiologiques et moléculaires permettent d'identifier les espèces. Selon l'édition 2012 du Manuel de Bergey, le phylum des actinobactéries comprend 5 classes, 19 ordres, 50 familles et 221 genres.

##### 2.1. Détermination des actinobactéries

###### 2.1.1. Critères morphologiques

Jusqu'à maintenant les critères morphologiques sont considérés comme des critères importants pour orienter l'identification des actinobactéries, dont l'observation des colonies poussant sur un milieu gélosé se fait à l'œil nu et surtout au microscope optique.

# Partie I : Etude bibliographique

---

## 2.1.1.1. Critères macromorphologiques

Ces critères reposent sur la production ou non d'un mycélium aérien (MA), la présence d'un mycélium du substrat (MS), la production ou non de pigments mélanoides, ainsi que la détermination de la couleur du MA, du MS et des pigments diffusibles. Les couleurs sont souvent déterminées grâce à l'utilisation de chartes de couleurs.

## 2.1.1.2. Critères micromorphologiques

Les critères micromorphologiques sont déterminés par l'observation au microscope optique et parfois au microscope électronique, dont les plus importants sont:

- La fragmentation ou non du MS.
- La formation de spores exogènes sur le MA et/ou sur le MS, leur forme, leur taille et leur agencement (isolées, en chaînes), la présence ou non de sporophores, la surface des spores (lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue).
- La présence ou non de sporanges sur le MA ou sur le MS, la forme et la taille des sporanges, le nombre de spores par sporange ainsi que la longueur des sporangiophores.
- La présence de spores mobiles ou non mobiles.
- La présence de structures particulières comme les sporanges, les sclérotés ou les synnemata (*Actinosynnema*) (Demain et Solomon, 1986).

La [Figure 1](#) montre la micromorphologie de quelques genres d'actinobactéries.

## 2.1.2. Critères chimiotauxonomiques

Selon les travaux de [Becker et al.](#), (1964); [Lechevalier et Lechevalier](#) (1970), certains constituants cellulaires (les acides aminés pariétaux, les lipides membranaires et pariétaux et les sucres cellulaires) ont une grande importance taxonomique dans la classification des actinobactéries ([Sabaou, 1988](#)).

## 2.1.3. Critères physiologiques et taxonomie numérique

La détermination des espèces est aussi basée sur les caractères physiologiques. Ceux-ci consistent en des tests de dégradation de différents composés glucidiques, lipidiques et protéidiques, polymères complexes, stéroïdes, etc. D'autres tests interviennent parfois dans la détermination des espèces, comme la résistance à certains agents antimicrobiens et la tolérance à des conditions extrêmes (Température, pH, salinité, etc.).

En 1957, [Sneath](#) développe une taxonomie qualifiée de numérique pour les bactéries. La méthode consiste à étudier, pour chaque souche, plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, structuraux... et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère). Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude les individus les plus semblables.

## Partie I : Etude bibliographique

---

### 2.1.4. Critères moléculaires

Actuellement, les caractéristiques morphologiques, physiologiques et chimiques sont considérées comme insuffisantes pour l'identification précise des espèces. L'introduction d'outils moléculaires a manifestement amélioré les techniques d'identification. Parmi les principales techniques moléculaires utilisées en taxonomie, nous citerons l'analyse des séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomiques 16 S, l'hybridation ADN-ADN et la détermination du pourcentage de guanine – cytosine.

#### 2.1.4.1. Analyse des séquences d'ADN codant pour l'ARN ribosomiques 16S

Cette technique a été utilisée pour la première fois par [Stackebrandt et ses collaborateurs \(1981a, 1983\)](#), pour la taxonomie des actinobactéries. L'étude de l'ADNr 16S utilise deux techniques de base: la PCR (Polymerase Chain Reaction) et le séquençage.

Dans cette analyse, la partie de l'ADN génomique (ADNr), est amplifiée par PCR, puis le produit PCR est séquencé et les séquences obtenues sont comparées avec des milliers de séquences d'espèces types disponibles dans des bases de données génomiques.

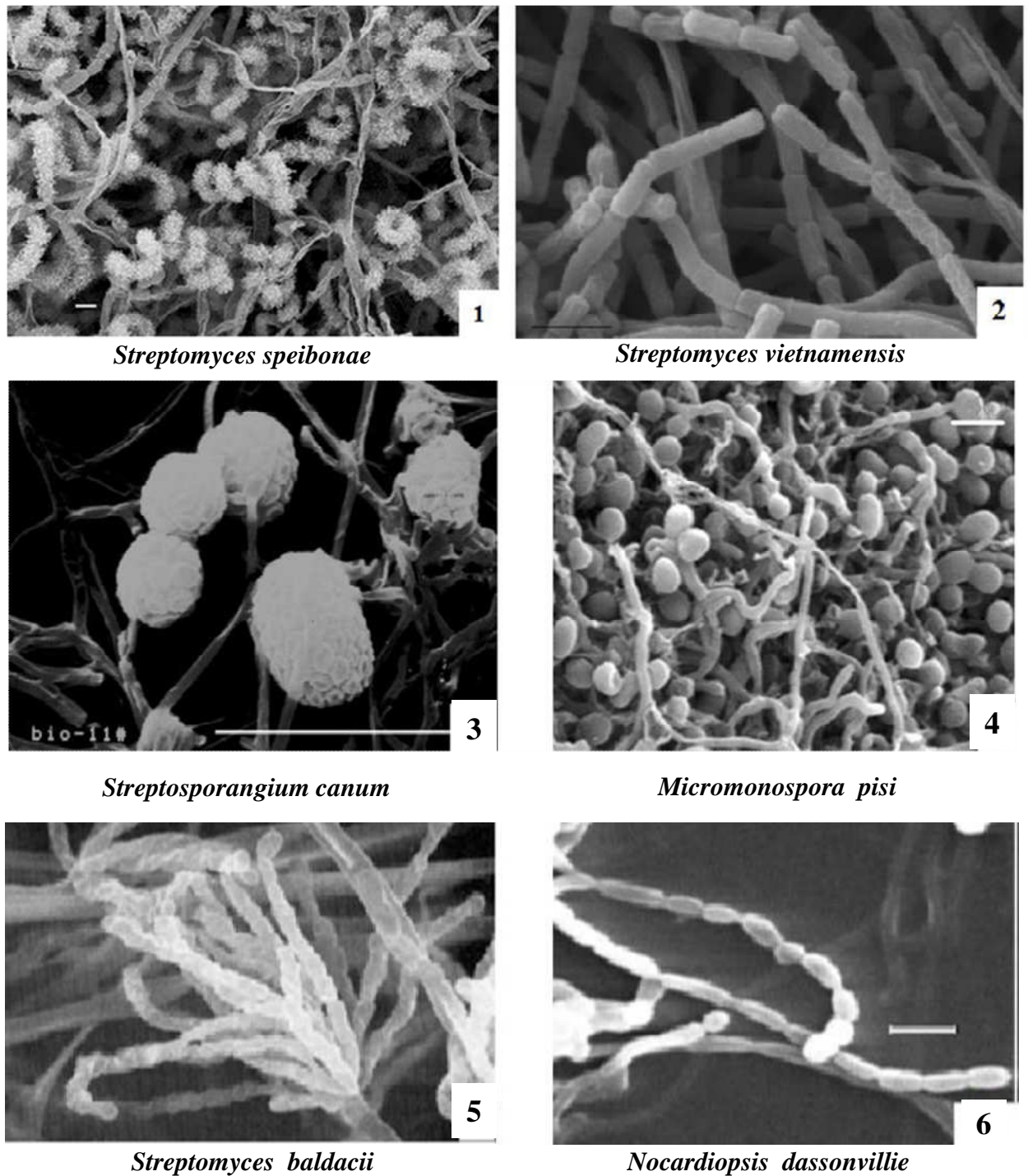
#### 2.1.4.2. Pourcentage en guanine – cytosine

En 1950, le biochimiste autrichien [Chargaff](#) a montré que le contenu en bases puriques et pyrimidiques de l'ADN peut varier d'un individu à un autre, mais relativement constant pour les individus de la même espèce.

Chez les bactéries, le pourcentage de G+C varie entre 25 et 75%, selon [Euzéby \(2002\)](#), les bactéries dont le taux de G+C diffère de plus de 5 % ne peuvent appartenir à une même espèce et que les bactéries dont le taux de G+C diffère de plus de 10 % ne peuvent appartenir au même genre. Les actinobactéries sont caractérisées par un taux de G+C égal ou supérieur à 55%, tandis que ce pourcentage chez les firmicutes est inférieur à 55%. De ce fait des bactéries à Gram positif non mycéliennes sont incluses dans le phylum des actinobactéries, (*Ex: Micrococcus, Mycobacterium, Arthrobacter, Cellulomonas*, etc..) et d'autres formes mycéliennes avec un taux de G+C inférieur à 55% sont exclues (ex: *Thermoactinomyces*).

#### 2.1.4.3. Hybridation ADN-ADN

Les méthodes de réassociations ADN-ADN sont également utilisées dans la classification des actinobactéries. Le principe consiste à déterminer le taux de ressemblance de l'ADN génomique de la souche étudiée avec celui des espèces les plus proches, suivant le taux de réassociation de leurs brins d'ADN. Ceci nous permet de savoir si la souche étudiée est une nouvelle espèce ou non. Deux espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance de l'ADN génomique inférieur à 70% ([Wayne et al., 1987](#)).



**Figure 1.** Micromorphologie de quelques genres d'actinobactéries.

1. chaînes de spores spiralées (type S) (Meyers *et al.*, 2003), 2. chaînes de spores droites à flexueuses (type RF) (Zhu *et al.*, 2007), 3. spores contenues dans un sporangium (Zhang *et al.*, 2009), 4. spores isolées (Garcia *et al.*, 2010), 5. spores formant des verticilles (Manuel de Bergey, 2012), 6. spores en bâtonnets et parfois espacées formant des chaînes droites (Hamedi *et al.*, 2010), S: Spira, RF: Rectus Flexibilis.



### 3. Le Genre *Planomonospora*

#### 3.1. Généralités sur le genre *Planomonospora*

Le genre *Planomonospora* fut décrit pour la première fois par [Thiemann et al., \(1967\)](#), il est caractérisé par la production de sporange cylindrique sur le mycélium aérien (MA) (1-1.5  $\mu\text{m}$  de diamètre et 3.5-5.5  $\mu\text{m}$  de longueur), contenant chacun une seule spore ([Vobis, 1989](#)). Les spores sont mobiles par des flagelles péritriches. Le mycélium de substrat (MS) ne se fragmente pas et ne produit ni sporange, ni spore, il peut être de couleur rose grisâtre, orange-clair, rose jaunâtre. Par contre, le mycélium aérien est blanc, blanc grisâtre ou rose. La majorité des espèces de ce genre sont chimioorganotrophes, mésophiles, se développent bien entre 28-37 °C et à un pH de 7 à 8.

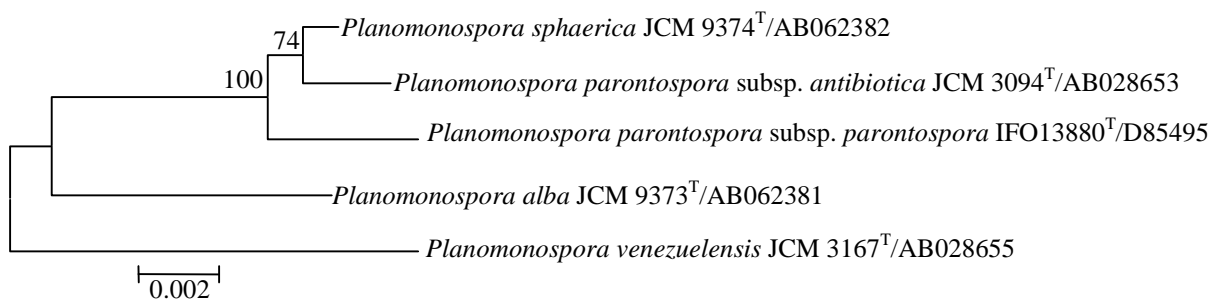
Les cellules appartenant à ce genre contiennent la forme isomérique DL de l'acide diaminopimélique (DAP) et du madurose (chimiotype IIIB), des phospholipides du type PIV (phosphatidyléthanolamine et phospholipides contenant de la glucosamine) et des ménaquinones majeures sont de type MK-9(H2), et/ou MK-9(H4). Leur contenu en G+C est de 72%.

#### 3.2. Taxonomie supragénérique du genre *Planomonospora*

Le genre *Planomonospora* appartient à la classe des *Actinobacteria*, l'ordre des *Streptosporangiales* ([Goodfellow, 2012](#)), et sous-ordre des *Streptosporangineae* ([Ward- Rainey et al., 1997](#)). et font partie de la famille des *Streptosporangiaceae* ([Goodfellow et al., 1990](#))

##### 3.2.1. Espèces appartenant au genre *Planomonospora*

Peu d'espèces du genre *Planomonospora* ont été isolées et bien décrites depuis les publications originales de Thiemann, actuellement le genre *Planomonospora* comprend 4 espèces: *P. parontospora* ([Thiemann et al., 1967](#)), avec deux sous-espèces: *P. parontospora subsp. parontospora* et *P. parontospora subsp. antibiotica*, *P. venezuelensis* ([Thiemann, 1970](#)), *P. sphaerica* et *P. alba* ([Mertz, 1994](#)) ([Figure 2](#)).



**Figure 2.** Dendrogramme montrant les relations phylogénétiques entre les espèces du genre *Planomonospora*, établi sur la base de l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S (Chaabane Chaouch, 2014).

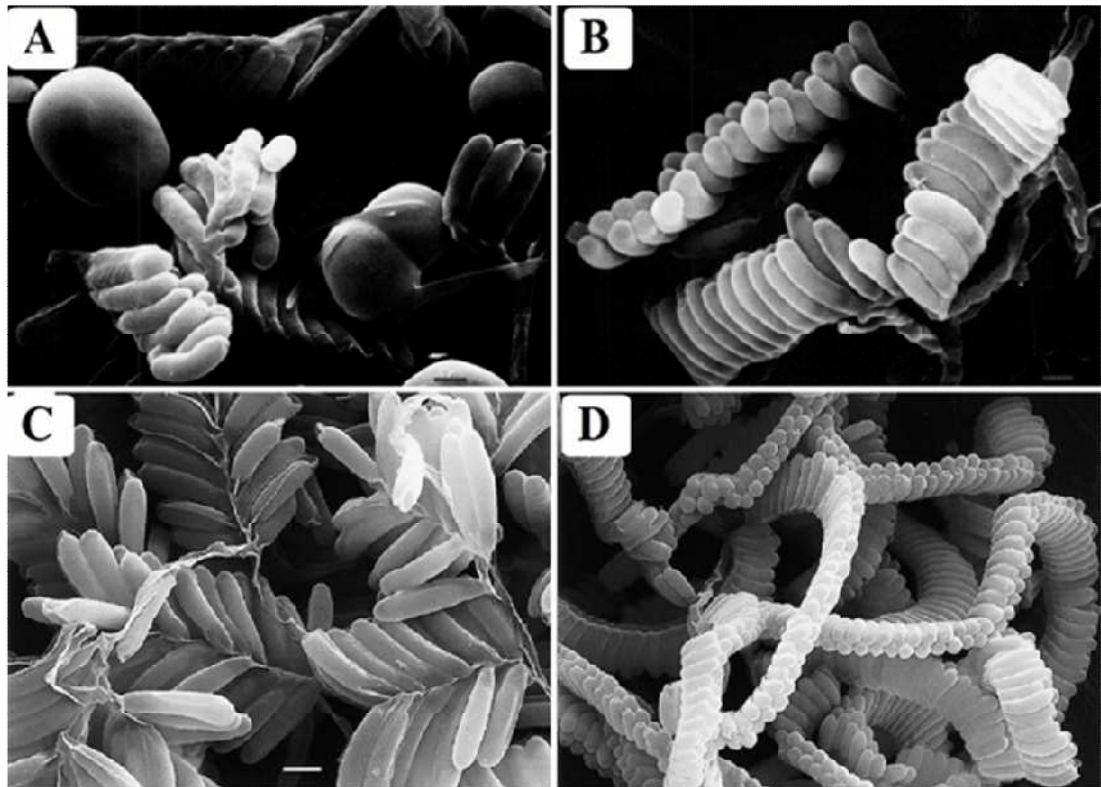
Ces 4 espèces sont différenciées entre elles par la couleur de mycélium aérien et du substrat ainsi que celle des pigments solubles, par la disposition des sporanges (dirigés vers un même côté et simulant un "peigne" ou arrangées de manière opposée comme les folioles de palmier dattier), la présence ou non de corps sphériques (vésicules ne contenant aucune spore mais capable de germer) et quelques caractères physiologiques.

Chez *P. parontosora*, l'espèce type, les sporanges sont sessiles et se produisent dans de doubles rangées parallèles sur les sporangiophores incurvés (famille *Streptosporangiaceae*)

Chez *P. alba* et *P. sphaerica*, les sporanges sont formés dans de longues rangées parallèles, qui ressemblent à des rangées de bananes (Mertz, 1994).

Les sporanges de *P. venezuelensis*, sont développés séparément ou dans des groupes sur les branches latérales courtes formant un modèle caractéristique de feuille de palmier (Thiemann, 1970). Phylogénétiquement, l'espèce *P. venezuelensis* est plus proche de certaines espèces du genre *Planobispora* que certaines espèces de *Planomonospora*.

La Figure 3 présente la micromorphologie des espèces appartenant au genre *Planomonospora*.



**Figure 3.** Micromorphologie de quelques espèces d'actinobactéries appartenant au genre *Planomonospora* vues au microscope électronique à balayage.

A. *P. sphaerica* JCM 9374<sup>T</sup> (Mertz, 1994) (avec présence de corps sphériques).

B. *P. alba* JCM 9373<sup>T</sup> (Mertz, 1994).

C. *Planomonospora* sp. AT 4552 (type *venezuelensis*) (Suzuki *et al.*, 2001a).

D. *Planomonospora* sp. AT 4610 (type *parontospora*) (Suzuki *et al.*, 2001a).

## 4. Ecologie des Actinobactéries

### 4.1. Distribution dans la nature

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre dans une grande variété d'habitats naturels. Ces bactéries peuvent coloniser de nombreux biotopes (air, composts, eau, fourrages, fumiers, grains, canne à sucre, etc.) et dans des zones géographiques variées: l'extrême nord, l'arctique, les tropiques, les plus hauts sommets des montagnes et les déserts (Lacey, 1997). Cependant, le sol représente le réservoir le plus riche en actinobactéries (Waksman, 1959; Porter, 1971; Lacey, 1973; Williams *et al.*, 1984). Ils constituent 10 à 20% de la microflore tellurique ou parfois plus (Dommergues et Mangenot, 1970; Ishizawa et Araragi, 1976). Leur nombre dépend de nombreux facteurs, dont la nature et l'abondance de la matière organique, la profondeur, le pH, l'aération et l'humidité (Theilleux, 1993). Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsable de l'odeur d'humus caractéristique des sols (Zaitlin *et al.*, 2003).

## Partie I : Etude bibliographique

---

Ils sont généralement saprophytes (genre *Frankia*). Certains sont pathogènes pour l'homme (*Mycobacterium tuberculosis*), d'autres pour les animaux (*Actinomyces bovis*) ou pour les végétaux (*Streptomyces scabies*, agent de la gale de la pomme de terre) (Loria, 1986).

### 4.2. Distribution dans les sols sahariens algériens

Les sols sahariens d'Algérie représentent des écosystèmes particuliers. En effets, les sols des palmeraies ont montré une diversité plus importante que ceux par exemple des sols de la Mitidja (Badis, 1992). Ces sols ont montré une grande diversité en genres d'actinobactéries, des plus abondants comme *Streptomyces* (Sabaou *et al.*, 1992), aux plus rares, voire même très rares dans le monde tels que *Actinomadura*, *Catellatosopra*, *Couchioplanes*, *Herbidospora*, *Nocardiopsis*, *Nonomuraea*, *Planobispora*, *Planomonospora*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, etc., (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998).

### 4.3. Distribution du genre *Planomonospora* et techniques d'isolement

Le genre *Planomonospora* est relativement rare. Il a été isolé en petits nombres et à partir d'échantillons réduits. Les membres de ce genre ont une distribution mondiale, mais assez réduite (Suzuki *et al.*, 2001a), ces auteurs ont rapporté l'isolement de 246 souches du genre *Planomonospora* à partir de 137 échantillons de sol sur les 1200 échantillons prélevés de 28 pays. Les souches de l'espèce "*P. parontospora*" sont présentes dans 10,9% des échantillons provenant de 14 pays. Les souches de l'espèce "*P. venezuelensis*" sont moins fréquentes et ont été détectées uniquement dans 13 échantillons (1,1%) issus de 8 pays. Mertz (1994) a isolé deux nouvelles espèces de *Planomonospora* (*P. alba* et *P. sphaerica*) par la technique du "baiting" en utilisant comme appât, des lames d'herbe stériles flottant sur la surface de l'eau. Une autre méthode sélective a été développée par Suzuki et ces collaborateurs (2001a) pour l'isolement de ce genre. Elle consiste à suspendre l'échantillon de sol dans une solution d'immersion renfermant 0,1% de lait écrémé, incubé pendant 90 min puis centrifugé avant d'être étalé sur le milieu "acides humiques-traces de sels-gomme gélifiante". Le prétraitement du sol par la chaleur sèche, 100 °C/1 h (Suzuki *et al.*, 2001a) et 120 °C/1 h (Boudjella, 1994 et 2007; Bouti 1997) est efficace pour l'isolement de ce genre.

## 5. Importance des Actinobactéries

### 5.1. Dans le domaine pharmaceutique et médical

Depuis la découverte des antibiotiques par Fleming chez le champignon *Penicillium notatum* en 1928, plus de 10 000 molécules ont été décrites à partir des bactéries mycéliennes (Solecka *et al.*, 2012). Les antibiotiques ont des effets thérapeutiques exploités en médecine humaine et vétérinaire, certaines molécules sont utilisées dans l'élevage industriel des animaux comme

## Partie I : Etude bibliographique

---

additif nutritionnel (Schwarz *et al.*, 2001). En plus de la production d'antibiotiques, les actinobactéries produisent également des substances à propriétés antitumorales et cytostatiques (carcinostatine, adriamycine, etc.), antimitotiques (ansamitocine, etc.), antihistaminiques, analgésiques, vasodilatateurs, inhibiteurs enzymatiques, immunostimulants et immunosuppresseurs (la rapamycine et le FK 500) (Tsuboya *et al.*, 1996; Demain, 1999). A côté de ces molécules, les actinobactéries produisent également des substances ayant des activités antiparasitaires telles que les antimalaria (distamycine), les acaricides (altémicidine, etc.), les anticoccidiens (Lombardi et Crisanti, 1997; Rätty *et al.*, 2002), et les insecticides (avermectine).

### 5.2. Dans le domaine agronomique

Les actinobactéries jouent un rôle important dans la fertilité des sols. Ils ont la capacité de produire une large variété d'hydrolases extracellulaires, qui leur confèrent un rôle dans la décomposition de la matière organique dans le sol. Ils ont la possibilité de s'adhérer aux interfaces non miscibles à l'eau en raison de l'hydrophobicité de leur paroi cellulaire. Les actinobactéries sont connues aussi pour leur pouvoir PGPR (Plant Growth Promoting Rhizobacteria). Le genre *Frankia* est également très important pour un bon nombre de plantes dicotylédones comme le casuarina (Becking, 1974); car il provoque des nodulations aux racines permettant ainsi la fixation de l'azote par la plante hôte (Zaitlin et Watson, 2006).

### 5.3. Dans divers autres domaines

Les actinobactéries interviennent dans la minéralisation du phénol et des déchets des industries textiles et de teinture (Bhatena *et al.*, 2002). Certaines substances, comme la pimarinine, sont utilisées pour le traitement des emballages et d'autres pour la protection de certains fromages (Vandamme, 1985).

## II. *Staphylococcus aureus* ET RESISTANCE A LA METHICILLINE

### 1. Les antibiotiques

#### 1.1. Généralités

Les antibiotiques sont des molécules issues du métabolisme secondaire des microorganismes, (Coates et Hu, 2007), dont les actinobactéries qui sont les plus grandes productrices de substances antimicrobiennes. Ce qui est remarquable est que la découverte des antibiotiques a profondément bouleversé la médecine moderne et diminué le taux de mortalité.

Dans la majorité des cas, la synthèse de ces substances débute à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et le début de la phase stationnaire (idiophase) (Bu'Lock, 1965). Cette phase de synthèse démarre lorsqu'un ensemble de conditions est présent: Carence en certains composants

## Partie I : Etude bibliographique

---

du milieu, sources de carbone, d'azote et d'éléments minéraux adéquats, ainsi que l'oxygénation et le pH (Dumenil et Sanglier, 1989).

### 1.2. Classification des antibiotiques

#### 1.2.1. Classification selon la structure chimique

La diversité et la complexité des molécules antibactériennes rendent nécessaire leur classification (Smaoui, 2010). Sur la base de leur structure chimique, neuf grandes familles d'antibiotiques ont été proposées par Berdy et ses collaborateurs (1987) et Berdy (2005). Le Tableau 1 regroupe ces 9 grandes familles, ainsi que leur sous familles.

#### 1.2.2. Autres critères de classification

Les antibiotiques utilisés à l'heure actuelle ont été classés selon: le spectre d'action, le type d'action, le mode d'action, l'origine de l'antibiotique et sa charge électrique (Asselineau et Zalta, 1973).

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

Selon le type d'action, Ils peuvent être bactéricides, sur les bactéries en voie de croissance uniquement (pénicillines, céphalosporines) ou en phase exponentielle et stationnaire (polymyxines, streptomycine), ou encore bactériostatiques (tétracyclines, chloramphénicol).

Selon leur mode d'action qui est très diversifié: soit sur la paroi bactérienne (pénicilline, cyclosérine, novobiocine), la membrane plasmique (polymyxines, tyrothricine, polyènes), les acides nucléiques (mitomycine, actinomycine), ou soit sur la synthèse protéique (tétracyclines, chloramphénicol, érythromycine).

Ils peuvent être d'origine fongique (pénicillines, céphalosporines, griseofulvine), bactérienne (bacitracine, polymyxines) ou des actinobactéries surtout le genre *Streptomyces*.

D'après leur charge électrique, les antibiotiques peuvent être à caractère acide (pénicilline, cephalosporine, novobiocines), basique (la majorité des macrolides) ou neutre (plusieurs molécules dont la steffimycine).

## Partie I : Etude bibliographique

**Tableau 1.** Classification des antibiotiques selon leur structure chimique (Berdy *et al.*,1987; Berdy, 2005)

<b>Familles d'antibiotiques</b>	<b>Sous familles</b>	<b>Exemples</b>
1 <b>Glucides et apparentés</b>	<b>Glucides purs</b>	Nojirimycine.
	<b>Aminoglycosides</b>	Streptomycine, gentamicine, kanamycine.
	<b>Glycosides</b>	C-glycosides : vancomycine. N-glycosides : streptothricine.
	<b>Glycolipides</b>	Moenomycine.
2 <b>Lactones macrocycliques</b>	<b>Macrolides</b>	Spiramycine, érythromycine.
	<b>Polyènes</b>	Amphotéricine, nystatine, candicidine.
	<b>Macrotétrolidés</b>	Tetranactine, nonactine.
	<b>Macrolactames</b>	Rifamicine.
3 <b>Quinones et apparentés</b>	<b>Polycycliques condensés linéairement</b>	Tétracyclines.
	<b>Dérivés naphtoquinoniques</b>	Anthracyclines.
	<b>Dérivés benzoquinoniques</b>	Mitomycine.
4 <b>Acides aminés et peptides</b>	<b>Dérivés d'acides aminés</b>	Cyclosérine , pénicilline, nocardicine.
	<b>Homopeptides</b>	Bacitracine, cyclosporine.
	<b>Hétéropeptides</b>	Aculéacine.
	<b>Peptolides</b>	Valinomycine.
5 <b>Hétérocycles à azote</b>	<b>Hétérocycles non condensés</b>	Caerulomycine.
	<b>Hétérocycles condensés</b>	Phénazines , Herbicidine.
6 <b>Hétérocycles à oxygène</b>	<b>Polyéthers</b>	Monensine, nigéricine.
7 <b>Composés alicycliques</b>	<b>Dérivés du cycloalcane</b>	Cycloheximide.
	<b>Terpènes</b>	Acide marasmique.
	<b>Oligoterpènes</b>	Acide fusidique.
8 <b>Aromatiques</b>	<b>Dérivésbenzéniques</b>	Chloramphénicol.
	<b>Aromatiques condensés</b>	Griséofulvine.
	<b>Composés non benzénique</b>	Fuoariocine.
	<b>Autres dérivés aromatiques</b>	Novobiocine.
9 <b>Aliphatiques</b>	<b>Dérivés des alcanes</b>	Flaiomycine.
	<b>Dérivés d'acides carboxyliques</b>	Cérulénine.
	<b>Composés contenant du phosphore ou du soufre</b>	Fosomycine.

## Partie I : Etude bibliographique

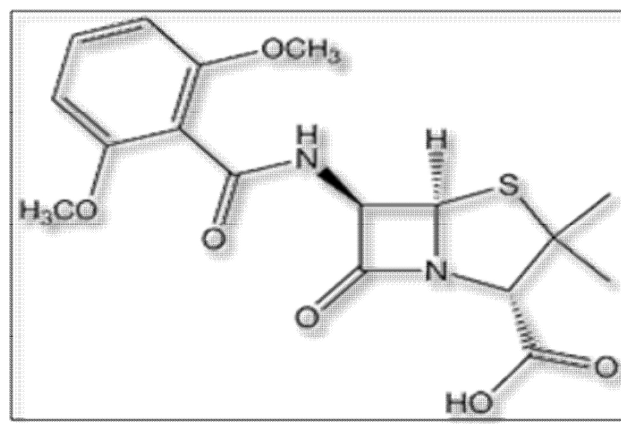
---

### 1.3. Les $\beta$ - lactamines

Les  $\beta$ -lactamines ont été les premiers antibiotiques découverts par [Alexander Fleming](#) en 1928 à partir de l'effet inhibiteur de la moisissure *Penicillium* sur une colonie de *S. aureus* ([Kong et al., 2010](#)), les  $\beta$ -lactamines demeurent jusqu'à ce jour les antibiotiques les plus utilisés en médecine humaine pour combattre les infections bactériennes. Ces antibiotiques possèdent tous un noyau  $\beta$ -lactame sur lequel sont greffés différentes chaînes latérales ([Demain et Elander, 1999](#)). Ils sont divisés en 4 classes, avec différents spectres d'activité: pénicillines (pénicilline G, oxacilline, méthicilline, cloxacilline, etc.), céphalosporines (céfalexine, céfuroxime, ceftriaxone, céfépime, etc.), carbapénèmes (imipénème, méropénème et ertapénème) et monobactames (aztréonam).

#### 1.3.1. La Méthicilline

La méthicilline est un antibiotique semi synthétique, du genre des  $\beta$ -lactamines et de la famille des pénicillines (pénicilline de groupe M) résistant à la pénicillinase. Introduite en 1959 comme un antistaphylococcique puissant pour traiter les infections causées par *Staphylococcus aureus* qui développe une résistance à la pénicilline, comme les autres  $\beta$ -lactamines, elle agit sur les différentes enzymes impliquées dans la formation du peptidoglycane.



**Figure 4.** Structure chimique de la méthicilline.

#### 1.3.2. Mécanisme d'action des $\beta$ - lactamines

La cible des  $\beta$ -lactamines est un ensemble d'enzymes de la membrane cytoplasmique nécessaires à la formation du peptidoglycane. Ces molécules se fixent d'une manière irréversible à l'une ou à l'autre de ces protéines appelées, « protéine liant la pénicilline, PLP ». Le substrat normal de ces PLP est l'acétyl-D-alanyl-D-alanine ([Tipper et Strominger, 1965](#)); la pénicilline et les autres  $\beta$ -lactamines agissent comme analogues de ces substrats. Ainsi, la fixation d'une  $\beta$ -lactamine sur les PLP entraîne l'absence de polymérisation du peptidoglycane et secondairement la synthèse par la bactérie d'autolysines conduisant à sa mort. Les  $\beta$ -lactamines sont donc bactéricides.



## Partie I : Etude bibliographique

### 1.4. Métabolites secondaires secrétés par le genre *Planomonospora*

Trois antibiotiques antibactériens sont élaborés par le genre *Planomonospora*. Le Tableau 2 représente une liste des métabolites bioactifs produites par le genre *Planomonospora*.

**Tableau 2.** Les métabolites secondaires secrétés par les espèces du genre *Planomonospora*.

Souche productrice	Produit	Nature chimique	Référence
<i>Planomonospora parontospora</i> subsp. <i>antibiotica</i>	Sporangiomycine	peptide	Thiemann <i>et al.</i> , 1968
<i>Planomonospora sphaerica</i>	Thiostrepton	peptide	Mertz, 1994
<i>Planomonospora alba</i> et <i>Planomonospora</i> sp. DSM14920	Planosporicine	peptide	Castiglione <i>et al.</i> , 2007; Sherwood <i>et al.</i> , 2013

Ces antibiotiques sont appelés: lantibiotiques; ce sont des peptides ribosomiques post-traductionnelles modifiés (Sherwood *et al.*, 2013; Sherwood et Bibb, 2013).

Les lantibiotiques sont produits par un nombre réduit d'actinobactéries (Li *et al.*, 2012; Sherwood *et al.*, 2013). Parmi ces substances bioactives on retrouve l'actagardine produit par *Actinoplanes garbadinensis* (Boakes *et al.*, 2009).

Le spectre d'activité du planosporicine est montré *in vitro* contre une gamme de bactéries gram positifs pathogènes, y compris les SARM et certains entérocoques, possédant actuellement une importance médicale en raison de l'augmentation de leurs mécanismes de résistance. Cet antibiotique empêche la biosynthèse de la paroi cellulaire de ces derniers.

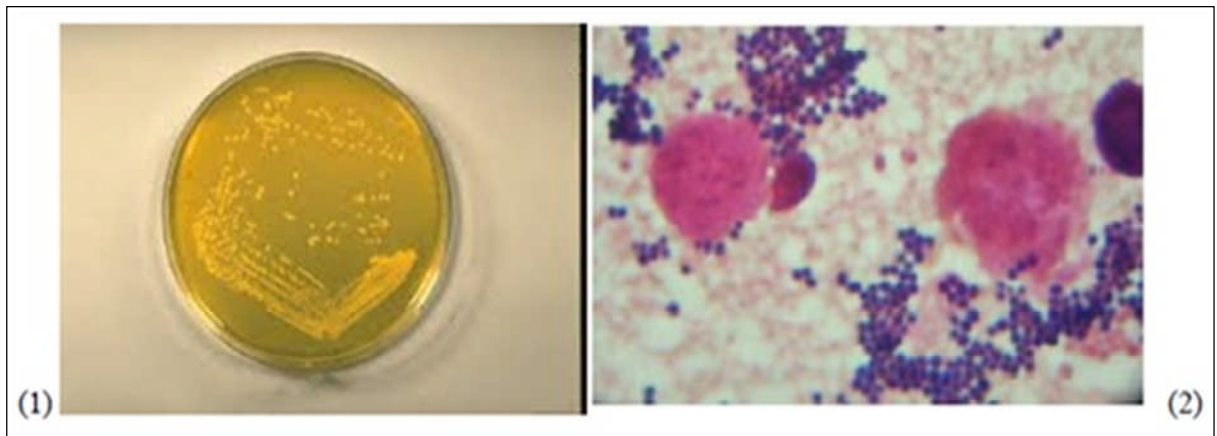
## 2. Le germe *Staphylococcus aureus*

### 2.1. Généralités

#### 2.1.1. Caractères bactériologiques

Les *Staphylocoques* ont été découverts dans un pus par Pasteur en 1880. En 1883, Ogston a créé le nom de «*Staphylocoque*» pour décrire ces grains (*kokkos*) groupés en amas irréguliers à la façon d'une grappe de raisin (*staphylos*).

*Staphylococcus aureus* est une coque à Gram positif, sphérique, de 0,5 à 1.5 µm de diamètre, immobile, non sporulé, parfois encapsulé (Sperber et Tatini, 1975; Foster, 1996). Toutes les souches produisent une catalase mais pas d'oxydase. Elles sont: indole (-), acétone (+), uréase (+). Ces bactéries sont aéro-anaérobie facultative (Liesse Iyamba, 2012). La température optimale de croissance est de 37 °C et le pH optimal est de 7,5 (Figure 5).



**Figure 5.** (1) Colonies de *Staphylococcus aureus* sur une gélose de Chapman, (2) Aspects caractéristiques en amas de coques à gram positif de *Staphylococcus aureus*. (Liesse Iyamba, 2012)

### 2.1.2. Taxonomie

La classification du genre *Staphylococcus* a subi plusieurs remaniements successifs qui reposent sur l'analyse des séquences des gènes codant pour l'ARN ribosomal (ARNr) 16s (Aouati, 2009)

**Règne:** *Bacteria*

**Phylum:** *Firmicutes*

**Classe:** *Bacilli*

**Ordre:** *Bacillales*

**Famille:** *Staphylococcaceae*

**Genre:** *Staphylococcus*

**Espèce:** *Staphylococcus aureus* (Rebiahi, 2012)

### 2.2. Facteurs de virulence et physiopathologie

La pathogénicité de *Staphylococcus aureus* est essentiellement due à l'expression de plusieurs facteurs de virulence (Davido, 2010). Ces facteurs expliquent la fréquence et la gravité des infections à *S. aureus*. Le **Tableau 3** suivant représente les principaux facteurs de pathogénicité chez *Staphylococcus aureus*.

## Partie I : Etude bibliographique

**Tableau 3.** Les principaux facteurs de pathogénicité produit par *Staphylococcus aureus* (Loucif, 2006).

Produits	Actions physiologiques
<b>Catalase</b>	Transforme l'eau oxygénée en eau et oxygène.
<b>Coagulase</b>	Réagit avec la prothrombine pour former un complexe qui peut cliver le fibrinogène et former un caillot de fibrine.
<b>DNAase</b>	Hydrolyse l'ADN.
<b>Entérotoxine</b>	Ce sont des exotoxines protéiques relativement thermostables et résistantes aux enzymes digestives, provoquant deux formes de maladies: les intoxications alimentaires et les entérocolites aiguës pseudo-membraneuses.
<b>Exfoliatine</b>	Provoque le syndrome d'exfoliation généralisé (ou syndrome de la peau ébouillantée) ainsi que l'impétigo bulleux staphylococcique.
<b>Hyaluronidase</b>	Hydrolyse l'acide hyaluronique du tissu conjonctif permettant la pénétration et la propagation des bactéries.
<b>B-lactamase</b>	Dégrade la pénicilline.
<b>Lipases</b>	Hydrolysent les lipides en acides gras et glycérol.
<b>Protéine A</b>	Antiphagocytaire par compétition avec les neutrophiles pour fragment Fc des IgG.
<b>Protéinases</b>	Hydrolysent les protéines.
<b>TSST-1</b>	Induit la production d'interleukine 1, elle est pyrogène et létale.

### 2.3. Infections due par *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* est une bactérie ubiquitaire et un agent commensal de la peau et des muqueuses de l'homme et des animaux à sang chaud. Cette bactérie est responsable de nombreux types d'infections nosocomiales et communautaires chez l'homme (Vincenot *et al.*, 2008; Kurlenda et Grinholc, 2012; Otto, 2012), il est au deuxième rang des infections nosocomiales derrière *Escherichia coli* et au deuxième des intoxications alimentaires par les entérotoxines après les salmonelles. Parmi les infections suppuratives superficielles cutanéomuqueuses: les furoncles, les folliculites, les impétigos, les sinusites et les otites en plus sont responsable de méningites, des infections respiratoires et urinaires (Foster, 1996; Harris *et al.*, 2002).

### 2.4. Mécanisme de résistance à la méthicilline

Le staphylocoque doré ne possède aucune résistance naturelle aux antibiotiques. L'utilisation massive des pénicillines G et V a conduit dès 1941 à l'émergence de bactéries résistantes à ces molécules (Figure 6). *S. aureus* ont développé des résistances à tous les antibiotiques mis sur le marché dont les classes d'antistaphylococciques majeurs. Deux principaux mécanismes sont impliqués dans la résistance acquise de *S. aureus* aux  $\beta$ -lactamines. Il s'agit de la production des  $\beta$ -lactamases, et de la modification de la cible des antibiotiques (Lowy, 2003).

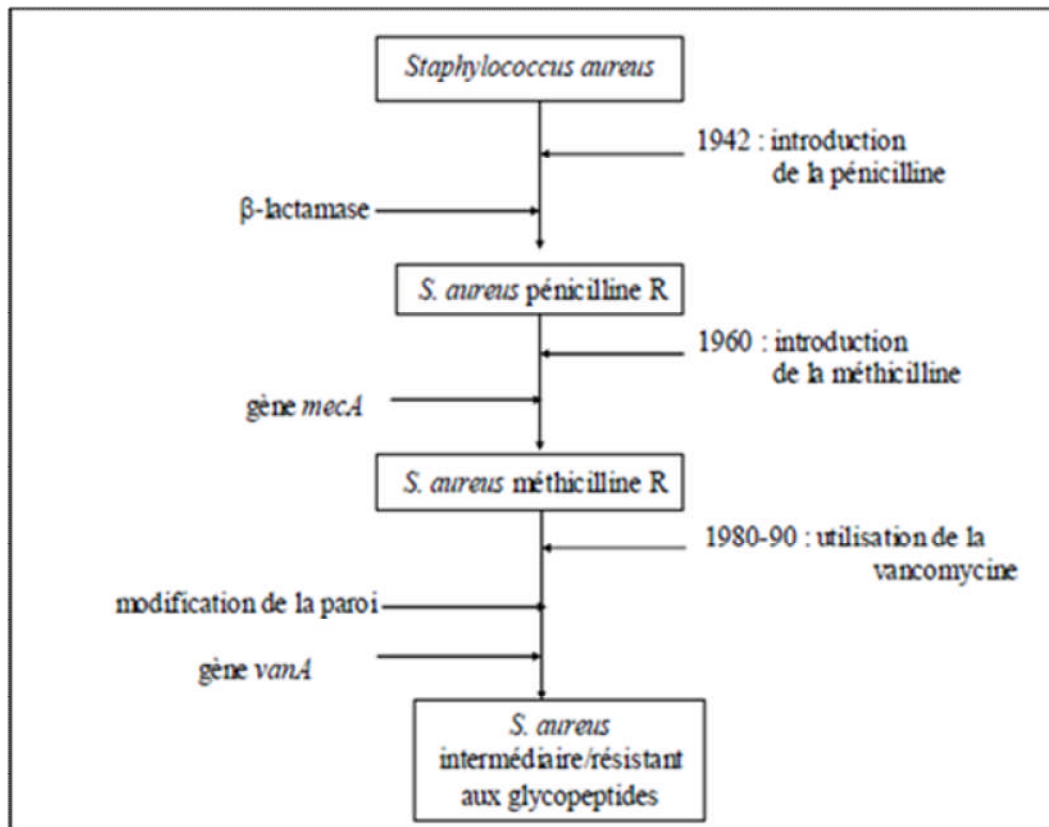
## Partie I : Etude bibliographique

---

*S. aureus* produit 4 types de PLPs impliquées dans la transpeptidation: PLP1, PLP2, PLP3, et PLP4. La résistance à la méthicilline par modification de la cible, appelée aussi résistance intrinsèque, est due à la production d'une 5ème PLP appelée PLP2a présentant peu d'affinité pour la méthicilline et toutes les autres  $\beta$ -lactamines (Utsui et Yokota, 1985). La PLP2a est codée par le gène *mecA* se trouvant sur un fragment d'ADN additionnel présent chez les *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) et absent chez les SASM (*Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline). Le gène véhiculé par un élément génétique appelé: Cassettes chromosomiques staphylococciques *mec* (SCC*mec*) dont l'expression dépend au moins de deux systèmes régulateurs agissant au niveau transcriptionnel.

Les souches de *S. aureus* présentant une résistance limite ou de bas niveau à la méthicilline n'ont pas de gène *mecA* (Jorgensen, 1991). Ce sont en fait les souches appelées BORSA (pour Borderline Resistant *S. aureus*) qui présentent une résistance à la méthicilline à cause d'une production accrue de  $\beta$ -lactamases, et les souches appelées MODSA (pour Modified Penicillin-Binding Protein) dont la résistance est due soit à une hyperproduction de PLP4 soit à la synthèse d'une PLP2 modifiée. Dans les deux cas, on a une diminution de l'affinité pour les  $\beta$ -lactamases. En Afrique, l'épidémiologie des SARM n'est pas très documentée. Les données semblent plus hétérogènes selon les pays: si le nombre des souches de SARM est plus élevé en Afrique noire (21 à 30%), il est plus faible au Maghreb avec des pourcentages inférieurs à 10% (4,8% en Algérie et 8,1% en Tunisie).

Face aux souches résistantes aux bêta-lactamines, il est nécessaire d'avoir recours à d'autres classes d'antibiotiques. Aujourd'hui, trois classes d'antibiotiques sont utilisées en routine pour le traitement des infections à SARM: les glycopeptides (vancomycine et téicoplanine) majoritairement, les oxazolidinones (linézolide) et la daptomycine (lipopeptide antibiotique). Par ailleurs, l'apparition des souches de sensibilité diminuée aux glycopeptides (GISA) ont très rapidement émergé partout dans le monde, d'abord au Japon (Hiramatsu *et al.*, 1997) puis aux USA (CDC, 1997). Des cas d'échec de traitement par daptomycine et par linézolide existent et sont rapportés dans la littérature.



**Figure 6.** Utilisation des antibiotiques et acquisition des résistances par *Staphylococcus aureus* (Aouati, 2009).

# **MATERIEL ET METHODES**

## I. MATERIEL BIOLOGIQUES

### 1. Souches d'actinobactéries et germes-cibles

#### 1.1. Souches du genre *Planomonospora*

Dix-sept (17) souches de *Planomonospora* provenant de la collection des microorganismes du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM). Ces souches ont été isolées à partir des échantillons des sols sahariens d'Algérie par [Chaabane Chaouch \(2014\)](#), et cela grâce à des agents sélectifs comme le prétraitement du sol par la chaleur sèche à 120 °C, la polymyxine comme agent spécifique pour l'isolement des souches appartenant à ce genre, et le lysozyme. L'isolement a été réalisé après incubation à 30 °C pendant 30 jours sur le milieu chitine-vitamines- B agar (Ch-VB) préconisé par [Hayakawa et Nonomura \(1987\)](#). Le [Tableau 4](#) montre des données sur les souches de *Planomonospora* utilisées.

**Tableau 4.** Données sur les souches utilisées ([Chaabane Chaouch, 2014](#)).

Région	Echantillon de Sol	Isolats	Agent sélectif
Bouda (Adrar)	TC	Pm9, Pm10	Lys
Béni-Abbés	BA1	Pm12, Pm14	P+Pol
(Bechar)	BA5	Pm1, Pm2, Pm3, Pm4, Pm15, Pm16, Pm17, Pm18, Pm19, Pm20 et Pm21.	Pol, P+Pol
	BA8	Pm6	Lys
Hoggar	HG1	Pm11	Pol

P: sol prétraité à 120 °C (chaleur sèche) pendant 1 h; Pol: Polymyxine (25 mg/L); Lys: lysozyme (500 mg/L); Pm: *Planomonospora*.

#### 1.1.1. Position taxonomique des souches du genre *Planomonospora*

Selon [Chaabane Chaouch \(2014\)](#), la position taxonomique des souches de *Planomonospora* utilisées dans notre étude pour la mise en évidence de leur activité antagoniste contre divers souches de SARM, est déterminée après un séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S. ce séquençage a permis de comparer ces séquences avec celles des souches de référence des actinobactéries contenues dans la base de données génomiques "EzTaxon-e", les résultats ont confirmé que les 10 souches (Pm1, Pm2, Pm3, Pm4, Pm9, Pm11, Pm12, Pm15, Pm18 et Pm20) appartiennent bien au genre *Planomonospora* et nos souches sont plus proches phylogénétiquement aux espèces: *Planomonospora parontospora* et *P. sphaerica*.

## 1.2. Microorganismes-cibles

Pour cette étude, quatre souches bactériennes à gram positif appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*S. aureus* ATCC43300, *S. aureus* ATCC29213, MRSA639c, MRSA3) ont été utilisées comme microorganismes-cibles pour déterminer les activités antagonistes et le spectre d'action des actinobactéries. Ces bactéries-cibles proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

## II. METHODES

### ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DU GENRE

#### *Planomonospora*

#### 1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches du genre

##### *Planomonospora* sur milieu solide (cylindres d'agar)

Cette méthode permet de sélectionner les souches de *Planomonospora* qui présentent une activité antibactérienne intéressante. D'après les résultats obtenus les souches les plus intéressantes seront retenues pour une étude approfondie de leurs composés antibactériens.

##### 1.1. Préparation et calibration des suspensions bactériennes

A partir d'une culture de 24h sur le milieu GN, une suspension de chaque germe cible (MRSA639c, MRSA3, *S.aureus* ATCC 43300 et *S.aureus* ATCC 29213) est préparée dans 10 mL d'eau distillée stérile. Les suspensions sont ensuite incorporées dans 20 mL de milieu de culture (GN) à raison de différents volumes (50µL, 100µL, 150µL et 200µL), puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. Après 24 h d'incubation à 37°C, le volume qui donne une croissance du germe sous forme d'une nappe avec des colonies juxtaposées sera retenu pour le test d'antagonisme (100 µL/100mL de milieu de culture).

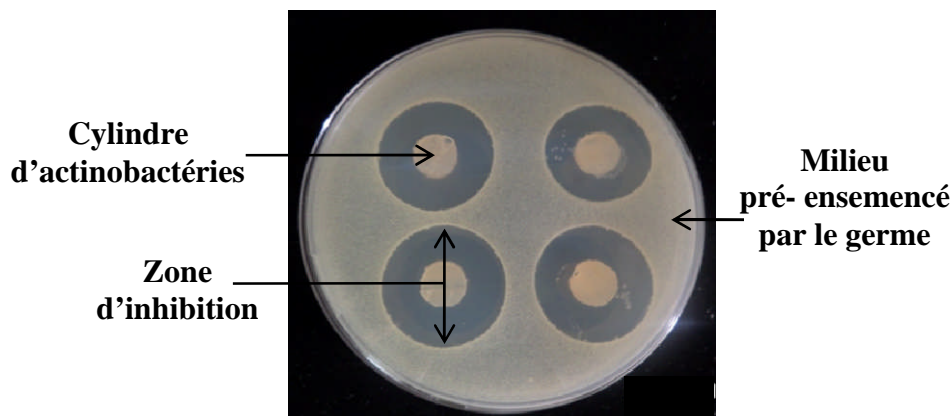
##### 1.2. Test de l'activité antagoniste

Cette méthode consiste d'abord à ensemencer les actinobactéries en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface de deux milieux de culture: le milieu Hickey-Tresner-Agar, HTA(Waksman, 1961), et le milieu Bennett(Warren *et al.*, 1955)(voir composition en [annexe n°1](#)). Les boîtes sont incubées à une température de 30 °C pendant 12 jours pour permettre aux actinobactéries de croître et de sécréter leurs composés actifs. Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'aide d'un emporte-pièce et déposés aseptiquement sur la surface du milieu GN semi solide (contient 12g/L d'agar, pour faciliter la diffusion des composés antibactériens) pré-ensemencé par la bactérie cible (ensemencement en masse)(Figure 7).



## Parti II : Matériel et méthodes

Les boîtes sont mises 2 h à 4 °C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 37°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des cylindres après 24 h d'incubation.



**Figure 7.** La méthode des cylindres d'agar.

### **2. Croissance et production des composés antibactériens en milieu liquide par les souches de *Planomonospora***

Le suivi des cinétiques de la croissance et de la production des composés antibactériens est réalisé pour les deux meilleures souches de *Planomonospora*, choisies d'après les résultats de la méthode des cylindres d'agar.

#### **2.1. Milieu de culture**

Les cinétiques de culture et de production des composés antibactériens ont été effectuées sur le milieu Bennett liquide. Il a été choisi comme meilleur milieu de production des composés antibactériens, au lieu du milieu HTA, car il a donné de meilleurs résultats lors des tests préliminaires sur le milieu solide.

#### **2.2. Pré-cultures**

Les pré-cultures sont obtenues en raclant les spores et les fragments à partir d'une culture de deux souches de *Planomonospora* désignées Pm1 et Pm11 âgées de 12 jours en croissance, et inoculés dans des Erlenmeyers de 250 mL contenant 50 mL de milieu de culture (Bennett liquide). Ces Erlenmeyers ont été incubés sous agitation dans un shaker à 250 rpm et à une température de 30 °C pendant 3 jours. Les pré-cultures sont utilisées pour inoculer le milieu de production.

### 2.3. Cinétiques de croissance et de production des composés antibactériens

La production des composés antibactériens, la croissance et le pH ont été suivis pendant 10 jours, pour cela, des Erlenmeyers de 500 mL (quatre Erlenmeyers) contenant 100 mL de milieu Bennettliquide (pH=7.5) ont été inoculés par 5 mL de pré-cultures, puis les cultures sont incubées dans un shaker à 30 °C sous l'agitation permanente à 250 rpm. Des prélèvements quotidiens (2 mL prélevés en double) ont été réalisés dans des Eppendorfs stériles (séchés et pesés). Ces derniers ont été soumis à une centrifugation de 12 000 rpm pendant 10 min dans une mini centrifugeuse (Sigma). Le surnageant est utilisé pour tester les activités antibactériennes et pour le suivi du pH, tandis que le culot est récupéré pour évaluer la biomasse.

#### 2.3.1. Evolution de l'activité des composés antibactériens

L'évaluation de l'activité antibactérienne des deux souches de *Planomonospora* Pm1et Pm11 contre les germes-cibles de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA 639c, *S.aureus* ATCC 43300et *S.aureus* ATCC29213) est déterminée par la méthode de diffusion des puits. Cette méthode consiste à utiliser un milieu GN semi solide (12 g/L), pré-ensemencé avec le germe-cible (100µL) avant d'être coulé en boîtes de Pétri (ensemencement en masse). Après solidification du milieu, des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce stérile de 10 mm de diamètre. 100 µL de surnageant de culture à analyser, est prélevé stérilement à l'aide d'une micropipette (embout stérile) puis introduit dans le puits.

Les boîtes sont mises au réfrigérateur (4°C pendant 2 h) afin de laisser les composés antibactériens diffuser dans la gélose tout en inhibant momentanément la croissance des germes cibles, et puis incubées à 37 °C. La lecture des résultats se fait en mesurant la zone d'inhibition autour du puits après 24 h d'incubation.

#### 2.3.2. Mesure du poids sec

L'évolution de la biomasse durant la fermentation est estimée selon la méthode de [Pfefferle et ses collaborateurs,\(2000\)](#). Pour cela, 4 mL de culture sont prélevés toutes les 24 h et mis dans 2 tubes Eppendorfs (2 mL par tube) après centrifugation pendant 10min à 12000 rpm. Le culot est ensuite séché à 105 °C durant 24 h puis pesé pour déterminer le poids de la matière sèche exprimé en gramme par litre de milieu de culture.

#### 2.3.3. Mesure du pH

L'évolution du pH a été suivie en utilisant le surnageant récupéré après la centrifugation en utilisant un pH mètre équipé d'une microélectrode(HANNA).

### 3. Extraction des composés antibactériens et antibiographie

Le protocole général de purification des substances antibactériennes passe par plusieurs étapes, principalement: L'extraction par les solvants et la purification par HPLC(Figure8).

L'extraction des molécules antibactériennes est effectuée à la fois à partir du filtrat et du mycélium (le jour de production optimale).

#### 3.1. Extraction à partir des filtrats de culture

L'extraction des composés antibactériens à partir du filtrat de culture est basée sur le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Quatre solvants de polarité croissante sont testés; (0 à 4,4): le *n*-hexane (00), le dichlorométhane (3,1), le *n*-butanol (4) et l'acétate d'éthyle (4,4); et cela, afin de connaître le meilleur solvant d'extraction.

Les cultures sont réalisées en milieu Bennett (meilleur milieu de production). Au total, 500 mL de milieu sont répartis à raison de 100mL par Erlenmeyer de 500 mL, ces derniers sont incubés à 30°C sous agitation à 250 rpm. Au jour de la production optimal des composés antibactériens, les cultures sont centrifugées (centrifugeuse de marque Jouan E96) pendant 15 min à une vitesse de 3000 rpm et puis filtrées. Les filtrats sont répartis en 4 fractions de 60 mL extraite chacune et mélangée dans une ampoule à décanter avec 60 mL de solvant à tester.

Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses, puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre dans le but d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles. Les extraits sont évaporés sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif puis repris dans 1 mL de méthanol (D'après plusieurs expériences l'effet de méthanol sur l'activité des extraits est déterminé comme inactif). Afin de tester l'activité antagoniste, des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 80 µL d'extrait à tester. Ces disques ont été séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid pour faire évaporer le méthanol.

La phase aqueuse obtenue après une double extraction au *n*-butanol, est également testée par antibiographie pour estimer l'activité résiduelle non extraite.

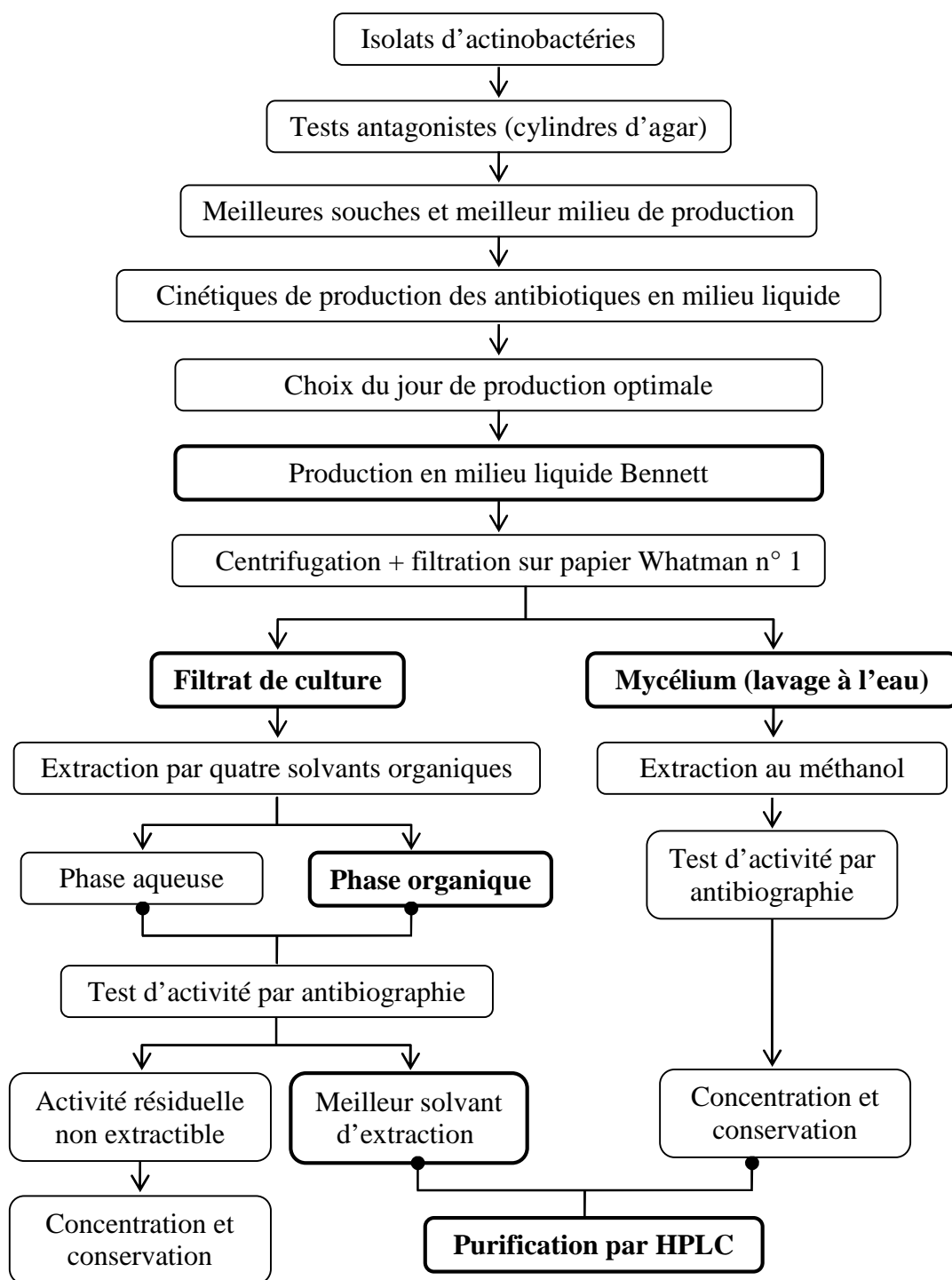
#### 3.2. Extraction à partir du mycélium

Le mycélium recueilli après centrifugation des cultures, est lavé 3 fois à l'eau distillée. Le culot mycélien de 33 g est immergé dans du méthanol (200 mL de MeOH pour 50 g de mycélium humide). Le tout est mis sous agitation magnétique pendant 2 h à température ambiante. L'extrait méthanolique est débarrassé du mycélium par centrifugation, puis concentré à sec à 40 °C à l'aide d'un rotavapor. Le résidu obtenu est récupéré dans 1 mL de méthanol avant d'effectuer les tests d'antibiographie.

### 3.3. Antibiographie

Dans le but de connaître le meilleur solvant d'extraction des composés antibactériens, Les différents extraits organiques obtenus à partir des filtrats ou du mycélium, ainsi que la phase aqueuse (après une double extraction au *n*- butanol), sont testés pour vérifier leurs activités antibactériennes vis-à-vis du germe-cible *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA639c). La méthode utilisée est celle des disques de papier.

Des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 80  $\mu$ L d'extrait à tester. Ils sont séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid pour faire évaporer le solvant, stérilisés sous UV à 254 nm pendant 45 min avant d'être déposés stérilement sur la surface du milieu GN à 12 g/L d'agar, pré-ensemencés avec le germe-cible puis coulés en boîtes de Pétri. Celles-ci sont mises à 4 °C pendant 2h dans le but de favoriser la diffusion des antibiotiques et inhiber momentanément la croissance du germe cible, et puis incubées à 37 °C. La lecture des résultats est effectuée après 24 h pour déterminer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque. Le solvant permettant d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé est considéré comme le meilleur solvant d'extraction.



**Figure8.** Protocole général de production, d'extraction, et de purification des composés antibactériens des souches d'actinobactéries sélectionnées.

### 4. Purification des molécules antibactériennes par HPLC

La chromatographie en phase liquide à haute Performance (CLHP); Quoique, l'abréviation anglaise HPLC (high performance liquid chromatography) est plus fréquente, est une technique de séparation analytique et/ou préparative de molécules présentes dans un mélange.

L'appareil utilisé dans notre travail est de marque Jasco, équipé des éléments suivants:

- Un injecteur automatique de type JASCO AS2055, relié à une boucle d'injection de 100  $\mu$ L.
- Une pompe binaire de type JASCO type PU-2080.
- Un dégazeur.
- Un détecteur UV-Visible dual band type UV-1575.
- Une interface numérique d'acquisition des données.
- Une colonne semi-préparative Waters XBridge de type C18 (200  $\times$  10 mm, granulométrie 5  $\mu$ m) ; précédé d'une pré-colonne Waters XBridge C18 (10  $\times$  10 mm, 5  $\mu$ m).
- Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: ChromNAV, chromatography data system.

Les conditions suivantes de purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires. La phase mobile est composée d'eau bidistillée et de méthanol (qualité HPLC) préalablement filtrés et dégazés.

La purification des composés antibactériens est réalisée par un gradient continu et linéaire. Ce programme commence par un flux linéaire (60% eau:40% Méthanol) pendant 2min, suivi par un gradient allant de 40 à 100% de méthanol dans l'eau pendant 23 min, ensuite un flux contenu (100% méthanol) pendant 10 min; le retour aux conditions initiales (60% eau: 40% Méthanol) c'est fait en 3min, ce flux a été maintenu pendant 10min. Le débit de l'éluant est de 1mL/min, et la détection se fait à 220 nm (détection de tous les composés).

Avant l'injection des échantillons, la colonne est conditionnée et équilibrée (conditions initiales) pendant 10 min. Les extraits sont dissous dans 1 ml de méthanol, filtrés à l'aide d'un filtre de 0,2  $\mu$ m de porosité puis introduit dans le système d'injection à raison de 80  $\mu$ L par injection. Les différentes fractions obtenues (représentées dans le chromatogramme sous forme de pics) sont récoltées, évaporées sous vide à 40°C puis testées par antibiographie contre les germes sensibles et cela afin de déterminer les fractions actives recherchées.

### 5. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne à la température

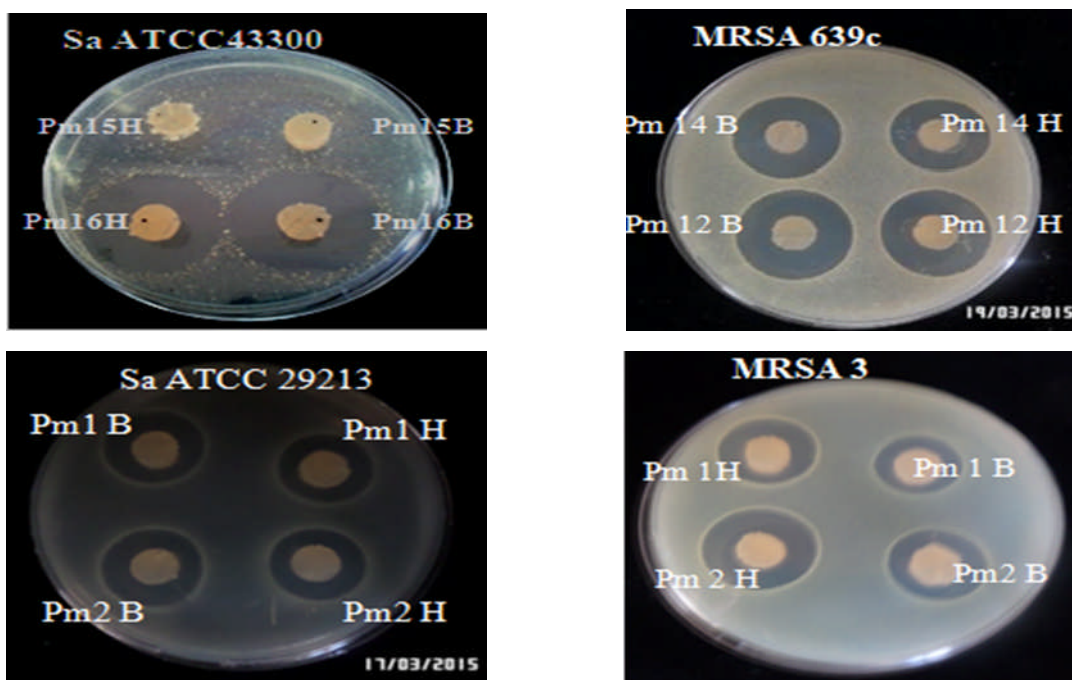
Un volume de 1 mL de l'extrait actif du dichlorométhane de la souche Pm11 a été soumis à un traitement par la chaleur humide: 120 °C pendant 20 min, ensuite testé par la méthode des disques de papier et l'activité a été comparée à celle obtenue avec l'extrait sans traitement.

## **RESULTATS ET DISCUSSION**

## I. ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE GENRE *Planomonospora*

### 1. Mise en évidence de l'activité antagoniste en milieu solide

L'activité antibactérienne de 17 souches de *Planomonospora* a été testée sur deux milieux solides; HTA et Bennett par la méthode des cylindres d'agar; et cela, contre quatre souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM): (MRSA 639c, MRSA 3, *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* ATCC 43300). Les résultats obtenus sont présentés dans la [Figure 9](#) et dans le [Tableau 5](#).



**Figure 9.** Activité antibactérienne par la méthode des cylindres d'agar de quelques souches de *Planomonospora*, cultivées pendant 12 jours à 30 °C sur les milieux solides HTA (H) et Bennett (B).



**Tableau 5.** Activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar des souches du genre *Planomonospora* sur les deux milieux solides HTA et Bennett.

Souches	Milieux	Activités antibactériennes (mm)			
		MRSA 639c	MRSA 3	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
Pm1	Bennett	32	25	30	24
	HTA	25	21	26	20
Pm2	Bennett	27	22	27	21
	HTA	24	19	22	19
Pm3	Bennett	-	-	-	-
	HTA	-	-	-	-
Pm4	Bennett	26	20	29	20
	HTA	22	18	25	20
Pm6	Bennett	26	19	30	20
	HTA	26	19	23	21
Pm9	Bennett	-	-	-	-
	HTA	-	-	-	-
Pm10	Bennett	-	-	-	-
	HTA	-	-	-	-
Pm11	Bennett	32	20	30	19
	HTA	23	18	25	19
Pm12	Bennett	26	23	30	19
	HTA	22	19	25	19
Pm14	Bennett	25	19	31	20
	HTA	21	16	25	20
Pm15	Bennett	-	-	-	-
	HTA	-	-	-	-
Pm16	Bennett	26	20	30	21
	HTA	26	19	26	21
Pm17	Bennett	26	19	32	23
	HTA	23	19	28	20
Pm18	Bennett	25	19	31	21
	HTA	25	19	28	21
Pm19	Bennett	-	-	-	-
	HTA	14	-	24	12
Pm20	Bennett	21	14	23	20
	HTA	13	-	21	16
Pm21	Bennett	-	-	-	-
	HTA	-	-	-	-

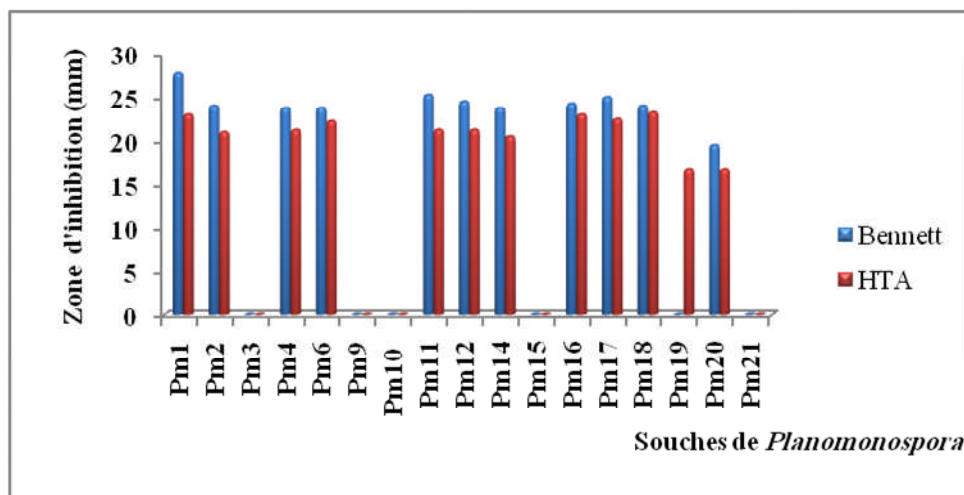
**Note:** -: résultat nul, MRSA 639c, MRSA 3, *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline.

### Partie III : Résultats et discussion

Sur les 17 souches de *Planomonospora*, 12 (70.6%) se sont montrées actives (activité moyenne à forte) contre les quatre souches de SARM utilisées (MRSA 639c, MRSA 3, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213). Le diamètre de la zone d'inhibition varie entre 12 et 32 mm; par exemple la souche Pm2 montre une forte activité dans les deux milieux (27 mm dans le milieu Bennett et 24 mm dans le milieu HTA) contre MRSA 639c, et de même pour la souche Pm6 présentant un pouvoir antagoniste contre la souche *S. aureus* ATCC 43300 avec une zone d'inhibition de 30 mm sur le milieu Bennett et 23 mm sur le milieu HTA.

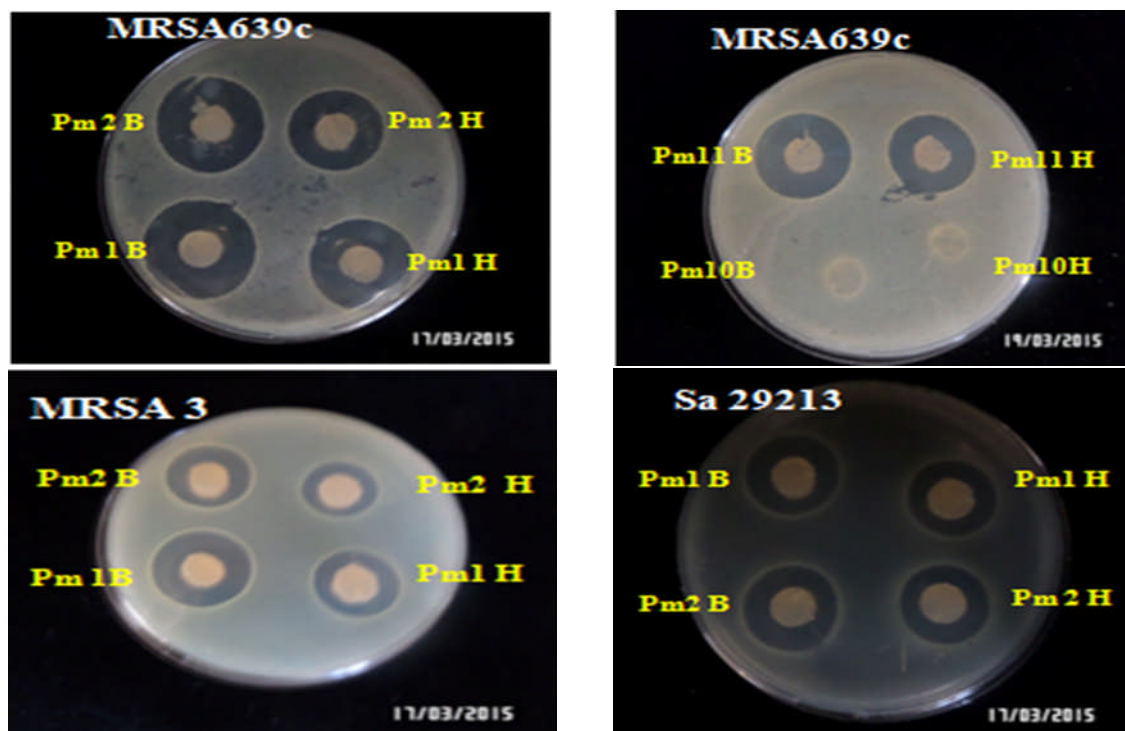
En revanche 29.4% des souches n'ont présenté aucune activité sur les deux milieux solides testés, le cas des souches Pm3, Pm9, Pm10, Pm15 et Pm21. Comme cas exceptionnel, la souche Pm19 s'est montrée active sur le milieu HTA contre les trois souches de SARM testées (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213), et non pas sur le milieu Bennett. Il faut noter que chez certaines souches de *Planomonospora*, l'activité est la même sur les deux milieux solides utilisés.

D'après les résultats, le milieu Bennett est choisi comme meilleur milieu de production des molécules antibactériennes pour nos futures études approfondies. La [Figure 10](#) montre que la majorité des souches de *Planomonospora* présentent une activité meilleure sur le milieu Bennett par rapport au milieu HTA.



**Figure 10.** Histogramme montre l'activité des souches de *Planomonospora* sur les deux milieux testés: Bennett et HTA

Les deux souches de *Planomonospora* Pm1 et Pm11 ont montré une activité meilleure par rapport aux autres souches (19 à 32mm) sur les deux milieux solides, mais avec une préférence pour le milieu Bennett. Les résultats obtenus sont illustrés dans la [Figure 11](#).



**Figure 11.** L'activité antagoniste des souches Pm1 et Pm11 par la méthode des cylindres d'agar contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline: MRSA 639c, MRSA 3, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213 sur les deux milieux solides Bennet (B) et HTA (H).

La production des composés antibactériens chez les souches de *Planomonospora* est détectée sur les deux milieux solides (HTA, Bennett) mais avec une nette préférence pour le milieu Bennett (contient: glucose, peptone, extrait de levure, et extrait de viande) par rapport au milieu HTA (contient: dextrine, extrait de levure, extrait de viande et peptone). Ce milieu est déjà été utilisé par plusieurs chercheurs pour ce genre d'étude et est connu pour être parmi les meilleurs pour la production des antibiotiques (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007, Toumatia, 2010; Driche, 2010).

D'après les études menées par Chaabane Chaouch, (2014), le milieu HTA est nettement favorable pour les espèces du genre *Planomonospora* par rapport au milieu ISP2 pour la production des métabolites secondaires.

L'activité des souches d'actinobactéries varie suivant les milieux de culture. Pour certains, c'est le milieu ISP2 (qui contient de l'extrait de malt) et pour d'autres, le milieu Bennett (qui contient de la peptone). Ceci montre l'importance des composants du milieu de culture, dont certains jouent un rôle important en tant que précurseurs dans les voies de biosynthèses des métabolites secondaires. Le même constat a été fait par Badji (2006), Boudjella (2007), Driche (2010) et

[Toumatia \(2010\)](#). En effet, Une faible modification de la composition du milieu de culture peut favoriser ou inhiber cette production ([Messaoudi, 2013](#)).

Les résultats trouvés confirment que la composition du milieu de culture, en particulier la nature et la concentration des sources de carbone et de nitrogène, influent considérablement sur la quantité ainsi que la qualité des substances antimicrobiennes sécrétées par les actinobactéries ([Arasu et al., 2009](#) ; [Song et al., 2012](#)).

L'activité antibactérienne des souches *Planomonospora sp. Pm1* et *Planomonospora sp. Pm11* qui est globalement meilleure par rapport aux autres souches contre les quatre souches de SARM, ont été sélectionnées pour la suite de notre travail.

## II. PRODUCTION DE MOLECULES ANTIBACTERIENNES EN MILIEU LIQUIDE

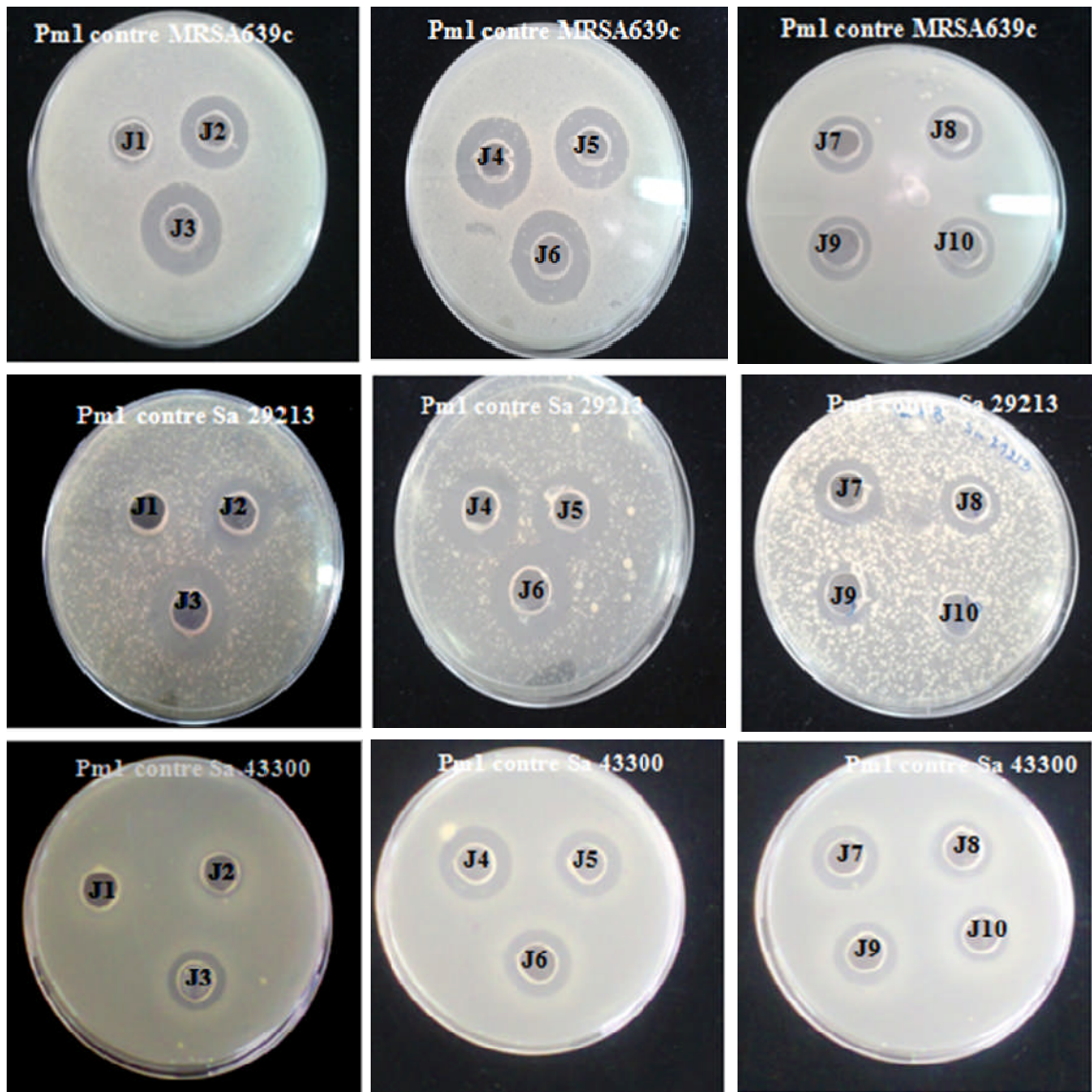
### 1. Cinétiques de production des composés antibactériens, de croissance et de pH des deux souches *Planomonospora sp. Pm1* et *Planomonospora sp. Pm11*

Pour la souche Pm1: les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche *Planomonospora sp. Pm1* on été suivies quotidiennement pendant 10 jours en milieu Bennett liquide. L'évolution de la production des antibiotiques est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre les souches de *Staphylococcus aureus* (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213) qui ont été choisies comme germes-cibles.

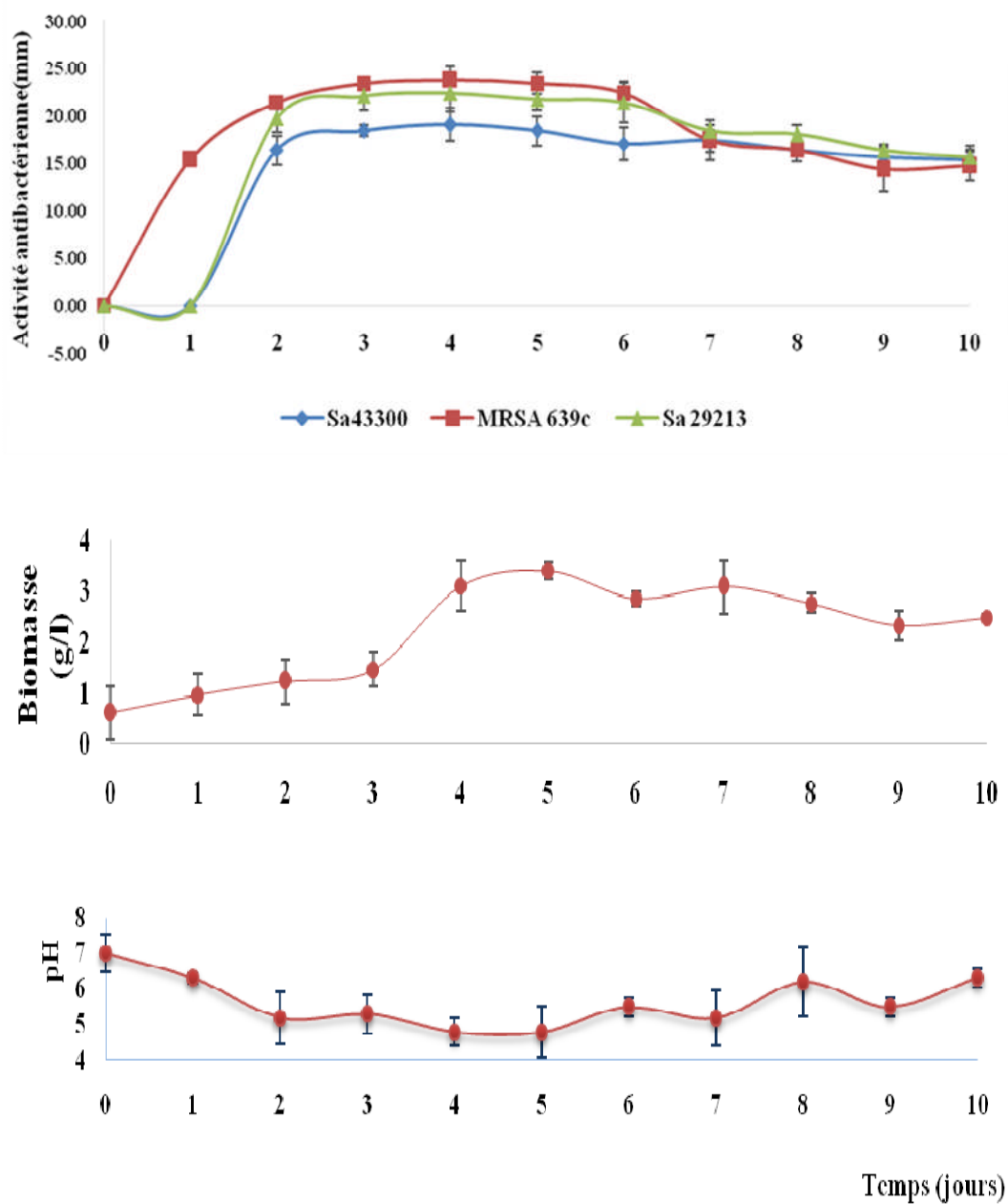
La production des composés antibactériens débute dès le 1<sup>er</sup> jour (15mm) contre la souche MRSA 639c, elle augmente et atteint un maximum le 4<sup>ème</sup> jour (23mm). Cependant, l'activité contre *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213 apparaît le 2<sup>ème</sup> jour (16 et 19mm respectivement), et atteint son maximum le 4<sup>ème</sup> jour (19 et 22mm respectivement). A partir du 5<sup>ème</sup> jour l'activité antibactérienne contre les trois souches de SARM diminue légèrement ([Figure 12](#)).

La courbe de croissance de la souche Pm1 débute par une phase exponentielle comprise entre le jour d'inoculation et le 5<sup>ème</sup> jour, qui est suivie par une phase stationnaire du 5<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour, à partir du 7<sup>ème</sup> jour une diminution de la biomasse a été observée, ceci correspond à la phase de déclin. Ensuite (du 9<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour), une croissance additive (assez faible), appelée communément croissance cryptique a été notée.

Le pH diminue (de 7 à 5,2) entre le jour d'inoculation et le 2<sup>ème</sup> jour, et puis il se stabilise entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, par la suite une augmentation légère est observée jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour. Les résultats de cinétique de production des composés antibactériens, de croissance et de pH sont illustrés dans la [Figure 13](#).



**Figure 12.** Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche Pm1 par la méthode des puits contre les souches SARM (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* ATCC 43300) du jour 1 (J1) au jour 10 (J10).

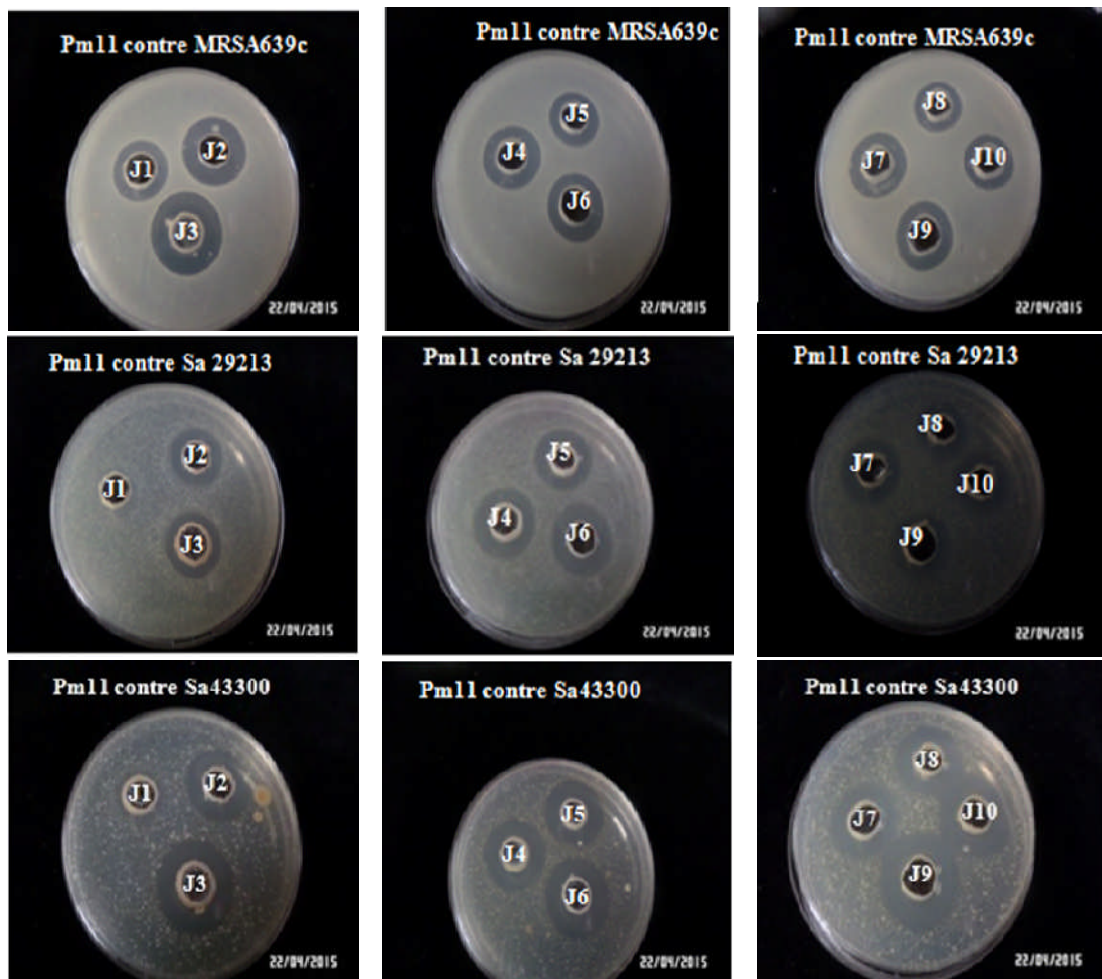


**Figure 13.** Cinétiques de l'évolution du pH, de la croissance et de l'activité antibactérienne de la souche Pm1 dans le milieu Bennett, contre des souches *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213).

Pour la souche Pm11: L'activité antibactérienne contre la souche MRSA 639c est débutée dès le 1<sup>er</sup> jour (19mm), elle augmente le 2<sup>ème</sup> jour (24mm) et atteint le maximum le 3<sup>ème</sup> jour (25mm), une stabilisation de l'activité est observée entre le 4<sup>ème</sup> et le 6<sup>ème</sup> jour. Cependant, l'activité contre *S. aureus* ATCC 43300 est aussi détectée dès le premier jour (19mm), elle atteint le maximum durant le 3<sup>ème</sup> jour (26mm), et pour la souche *S. aureus* ATCC 29213 l'activité est observée aussi à partir du premier jour (18mm) et atteint son maximum au bout du 3<sup>ème</sup> jour (22mm), et à partir du 4<sup>ème</sup> jusqu'au 7<sup>ème</sup> jour, on observe une stabilisation de l'activité, entre le 9<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour une augmentation légère a été notée contre les trois germes-cibles testés (Figure 14).

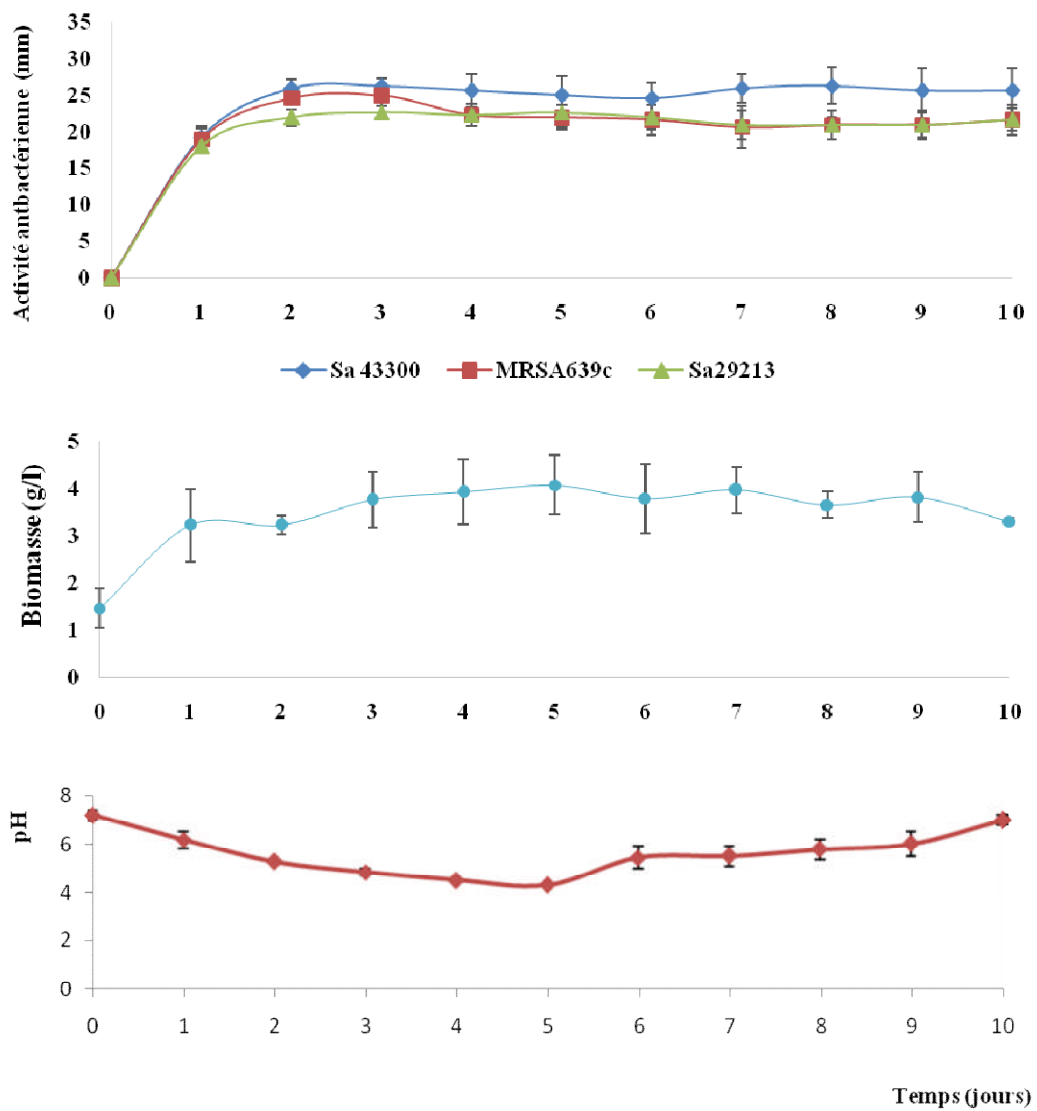
La courbe de croissance de *Planomonospora sp.* Pm11 a débuté par une phase exponentielle comprise entre le jour d'inoculation et le 5<sup>ème</sup> jour, ensuite d'une phase stationnaire allant du 5<sup>ème</sup> au 9<sup>ème</sup> jour, suivi d'une phase de déclin jusqu'au 10<sup>ème</sup> jour.

Le pH diminue de 7.2 à 4.87 à partir du jour de l'inoculation jusqu'au 3<sup>ème</sup> jour de culture, se stabilise entre le 3<sup>ème</sup> et le 5<sup>ème</sup> jour, ensuite une légère augmentation du 6<sup>ème</sup> au 10<sup>ème</sup> jour. Les résultats sont illustrés dans la Figure 15.



**Figure 14.** Mise en évidence de l'activité antibactérienne de la souche Pm11 par la méthode des puits contre des souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* ATCC 43300) du jour 1 (J1) au jour 10 (J10).





**Figure 15.** Cinétiques de l'évolution du pH, de la croissance et de l'activité antibactérienne de la souche Pm11 dans le milieu Bennett, contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213).

La production des antibiotiques débute dès le début de la phase exponentielle, et continue jusqu'à la phase de déclin; et cela, pour les deux souches de Pm1 et Pm11, Mais les maxima de production sont toujours observés durant la phase exponentielle des deux souches. En général, la production des métabolites secondaires par les microorganismes a lieu durant la phase de ralentissement et la phase stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries cette production peut avoir lieu en phases exponentielle, stationnaire et de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006). Durant les phases de déclin, les cellules se lysent et libèrent les quantités d'antibiotiques non encore sécrétés.

Les cinétiques de croissance des deux souches sur le milieu Bennett liquide ne présentent pas de phase de latence, qui correspond au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture. Elle est observée surtout lorsque l'inoculation est réalisée avec des spores ou des pré-cultures âgées ou préparées dans des conditions différentes, l'absence de cette phase est donc expliquée par le fait que nos pré-cultures sont menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles sont prises en phase exponentielle de croissance. Cette phase est estimée précédemment à 3 jours pour les espèces du genre *Planomonospora* (Chaabane Chaouch, 2014), car ce genre se caractérise par une croissance lente par rapport aux autres genres tel que *Streptomyces*.

La diminution du pH durant la croissance exponentielle des deux souches est expliquée par la dégradation des sucres (notamment le glucose) et la libération des acides organiques couplée probablement à une faible consommation de la peptone et des autres sources azotées représentées par l'extrait de levure et l'extrait de viande. Par la suite, le milieu devient progressivement basique après l'apparition des ions ammonium issus de la dégradation des sources azotées organiques tels que les acides aminés présents dans l'extrait de levure et la peptone. De telles constatations ont été énoncées par Strub (2008) pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions d'ammonium dans la culture de *Saccharothrix algeriensis* lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques. Une augmentation légère de pH a été notée durant la phase de croissance additive avec la souche *Planomonospora sp.* Pm1.

La croissance additive, signalée chez la souche Pm1 (entre le 9<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour), a été observée chez plusieurs microorganismes notamment les entérobactéries (Prescott *et al.*, 2002). Cette croissance s'explique par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin.

Les courbes d'activité des souches Pm1 et Pm11 sont régulières et présentent chacune un seul maximum au cours de la phase exponentielle, ce qui peut suggérer la sécrétion d'un seul produit bioactif par souche. Par contre, plusieurs maxima de productions d'antibiotiques ont également

été observés lors des cinétiques de certaines souches de *Streptomyces* qui se sont avérées en fin de compte capables de produire chacune 3 à 4 antibiotiques (Driche, 2010; Toumatia, 2010).

### III. EXTRACTION DES COMPOSES ANTIBACTERIENS ET ANTIBIOGRAPHIE

#### 1. Extraction des composés antibactériens par les deux souches: *Planomonospora* sp. Pm1 et *Planomonospora* sp. Pm11

##### 1.1. Extraction à partir du filtrat de culture

Les filtrats de culture des deux souches Pm1 et Pm11 sont récupérés. Afin d'extraire les composés antibactériens, 4 solvants organiques de polarités différentes (*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) sont testés. Un volume de 60 mL de filtrat de chaque culture est extrait par un volume égal de solvant, les extraits organiques sont concentrés à sec, puis récupérés dans 1 mL de méthanol pour tester leur activité par la méthode des disques de papier (80 µL par disque) contre la souche MRSA 639c. Les résultats des phases organiques sont illustrés dans le [Tableau 6](#).

D'après les résultats des tests d'activité des extraits organiques par antibiographie, le choix du meilleur solvant d'extraction des composés antibactériens s'est fait.

Les résultats d'antibiographie illustrés dans la [Figure 16](#) montrent que tous les extraits organiques sont actifs contre la souche MRSA 639c, d'après ces résultats il s'est avéré que le meilleur solvant d'extraction pour la souche Pm1 est le *n*-butanol avec une zone d'inhibition de 19mm, suivi par l'acétate d'éthyle, le dichlorométhane et l'hexane avec des zones d'inhibitions de 17, 15 et 16mm respectivement, mais l'acétate d'éthyle a été choisie préférentiellement comme meilleur solvant pour l'extraction des composés antibactériens sécrétés par la souche Pm1. Cependant, le meilleur résultat pour la souche Pm11 est obtenu à partir de l'extrait au dichlorométhane avec une zone d'inhibition de 21mm.

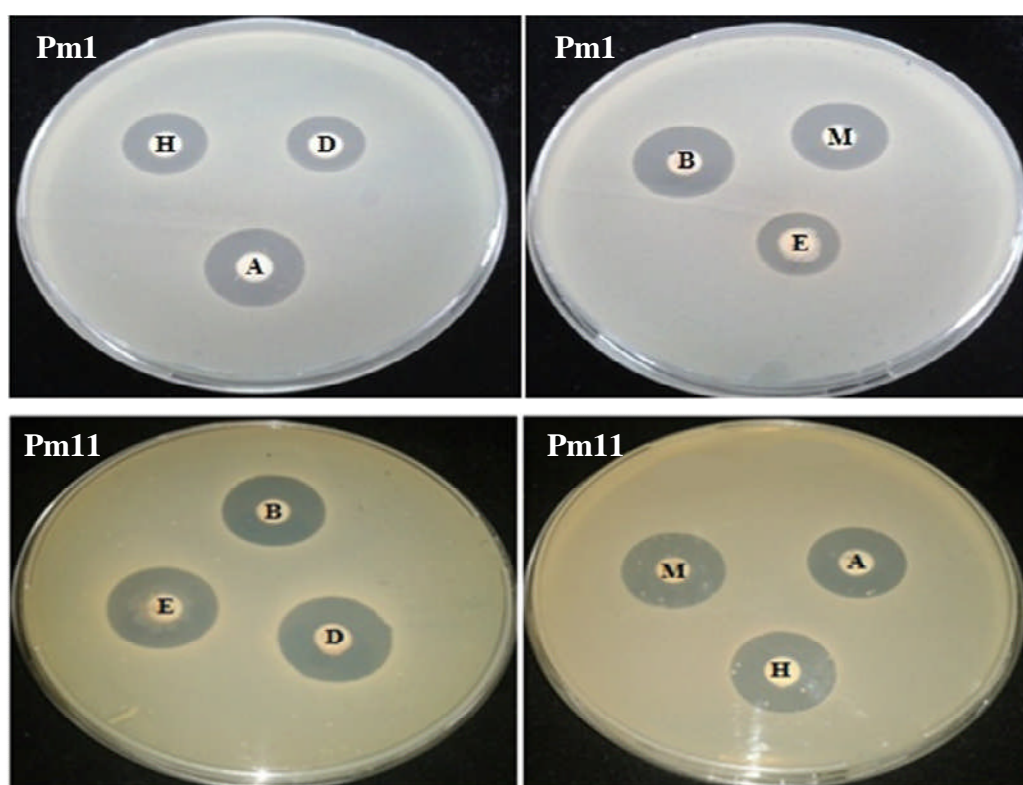
La phase aqueuse obtenue après une double extraction au *n*-butanol a été concentrée à sec, puis récupérée dans l'eau, une antibiographie à été réalisée par la méthode des disques de papier, les résultats ont montré la présence d'une activité résiduelle antibactérienne dont la zone d'inhibition est de 14mm pour la souche Pm1 et de 20mm pour la souche Pm11.

##### 1.2. Extraction à partir du mycélium

Les résultats obtenus des extraits méthanolique du mycélium ont montré la présence d'une activité antibactérienne contre MRSA 639c, avec une zone d'inhibition de 18mm pour la souche Pm1 et de 20mm pour la souche Pm11.

**Tableau 6.** Résultats des tests d'activité par antibiographie pour les deux souches Pm1 et Pm11 contre la souche MRSA 639c des extraits organiques, de la phase aqueuse et du mycélium, les chiffres correspondent aux zones d'inhibitions en mm.

Souche	Extraits organiques					
	<i>n</i> -hexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	<i>n</i> -butanol	Phase aqueuse	Mycélium
Pm1	16	15	17	19	14	18
Pm11	19	21	19	20	20	20



**Figure 16.** Résultats des tests d'activité par antibiographie des différents extraits des deux souches Pm1 et Pm11, contre la souche MRSA 639c. **Note :** H., *n*-hexane; D., dichlorométhane ; A., acétate d'éthyle ; B., *n*-butanol ; M., mycélium ; E., phase aqueuse de *n*-butanol (après une double extraction). Le diamètre du disque (6 mm) est inclus dans les valeurs des diamètres d'inhibition.

Les composés antibactériens des deux souches d'actinobactéries sont produits dans le milieu de culture; et à l'intérieur du mycélium. D'une manière générale, les antibiotiques extracellulaires sont les mêmes que ceux qui sont intracellulaires (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007), dans certains cas assez rares, ils peuvent être différents (Hacène *et al.*, 1994). Boudjella(2007) et Boubetra (2013) ont noté la présence d'activités antimicrobiennes dans le filtrat de culture et aussi dans le mycélium des souches *Streptosporangium sp.* SG3 et *Saccharothrix hoggarensis* DSM 45457<sup>T</sup>, respectivement.

Le pouvoir d'extraction du *n*-butanol est tellement élevé qu'il extrait malheureusement aussi beaucoup d'impuretés, ce qui peut parfois rendre la purification finale assez difficile (Lamari, 2002a; Zitouni, 2005; Merrouche *et al.*, 2010). Pour cela, d'autres chercheurs ont choisi des solvants moins polaires, comme le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle (Aouiche, 2013; Boubetra, 2013).

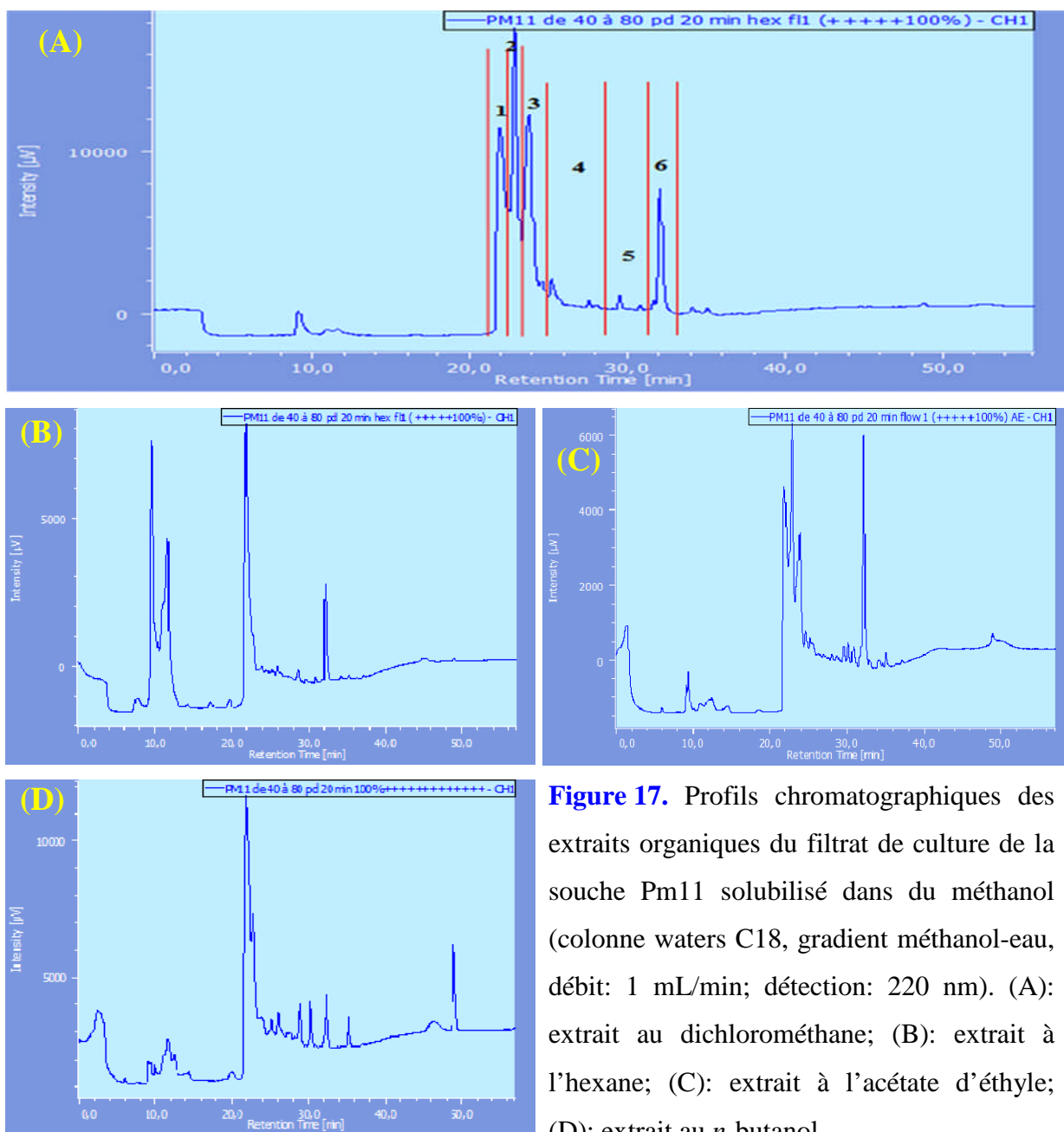
Un ou plusieurs composés antibactériens des filtrats de culture des souches Pm1 et Pm11 restent toujours dans la phase aqueuse, car ils ne sont pas extractibles par les quatre solvants organiques utilisés. Ces produits ont une activité intéressante contre la souche MRSA 639c. Plusieurs antibiotiques hydrophiles (antibiotiques nucléotidiques, antibiotiques glucidiques, etc.) ont déjà été mis en évidence chez des souches de *Saccharothrix*, de *Streptosporangium* et de *Streptomyces* d'origine saharienne (Zitouni *et al.*, 2005; Boudjella, 2007; Driche, 2010).

## IV. PURIFICATION DE COMPOSES ANTIBACTERIENS DE LA SOUCHE *Planomonospora sp.* PM11 PAR HPLC

### 1. Analyse par HPLC des extraits organiques du filtrat de culture

L'analyse par HPLC de l'extrait au dichlorométhane (meilleur solvant d'extraction) du filtrat de culture de la souche Pm11 a montré la présence de plusieurs pics, dont quatre pics sont principaux (pics 1, 2, 3, et 6), leurs temps de rétention étaient de 21.5, 22.5, 23.5 et 32.2 min respectivement. L'analyse a permis de détecter aussi plusieurs pics secondaires (pics 4 et 5) avec des temps de rétention allant de 24.5 à 32 min (Figure 17 (A)).

L'analyse par HPLC des deux autres extraits organiques (l'hexane, l'acétate d'éthyle) des filtrats de culture de la souche Pm11, a révélé des profils chromatographiques semblables (par rapport au nombre de pics majoritaires) à celui obtenu avec le dichlorométhane. Cependant, l'analyse par HPLC de l'extrait organique au *n*-butanol a révélé un profil chromatographique plus-ou-moins différent des profils précédents (présence de nouveaux pics) (Figure17 ).



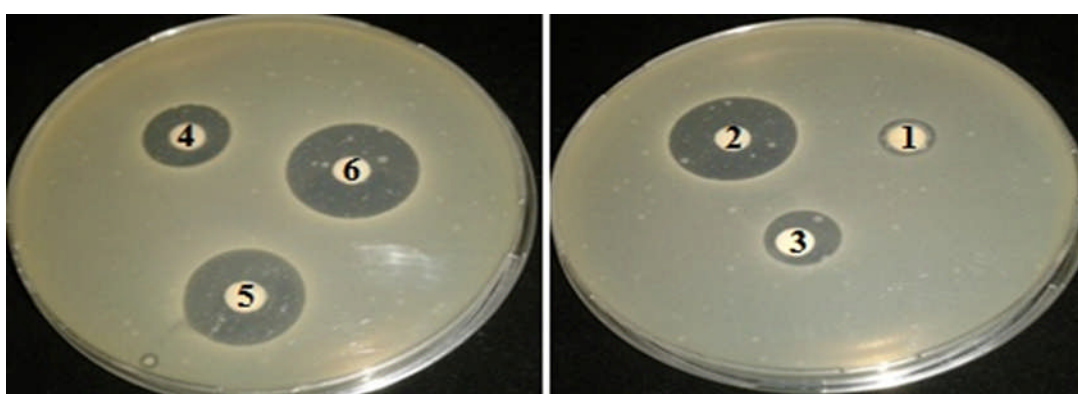
**Figure 17.** Profils chromatographiques des extraits organiques du filtrat de culture de la souche Pm11 solubilisé dans du méthanol (colonne waters C18, gradient méthanol-eau, débit: 1 mL/min; détection: 220 nm). (A): extrait au dichlorométhane; (B): extrait à l'hexane; (C): extrait à l'acétate d'éthyle; (D): extrait au *n*-butanol.

Les fractions correspondant à chacun des pics sont recueillies séparément, évaporées, reprises dans 100 µL de méthanol et testées par antibiographie (disque en papier de 6 mm de diamètre) contre MRSA 639c. Le [Tableau 7](#) représente les diamètres des zones d'inhibition (mm) des fractions obtenues par l'analyse HPLC de l'extrait au dichlorométhane.

Les fractions des pics 2 et 6 présentent une forte activité, contrairement aux fractions des pics 1 et 3 qui ont montré une activité très faible contre MRSA 639c. Pour les pics secondaires représentés par les deux fractions 4 et 5 (voir [Figure 17\(A\)](#)), l'activité est aussi importante comparativement à celle des pics principaux 2 et 6 ([Figure18](#)).

**Tableau 7.** Activité antibactérienne des fractions issues de l'analyse par HPLC de l'extrait au dichlorométhane contre la souche MRSA 639c.

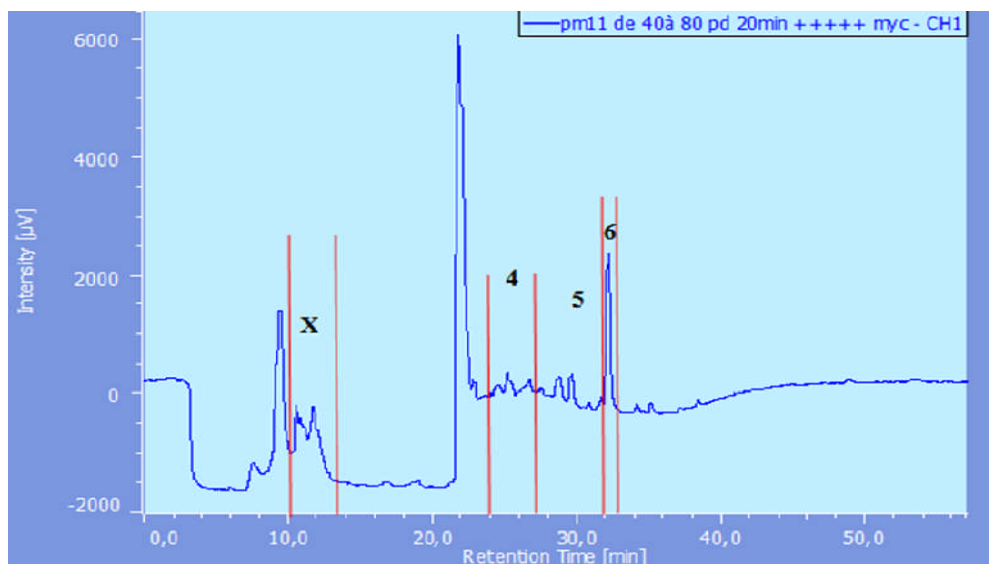
Fractions purifié par HPLC	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Pic 1	9
Pic 2	23
Pic 3	13
Pic 4	16
Pic 5	20
Pic 6	23



**Figure 18.** Test d'activité par antibiographie des fractions issues de l'analyse par HPLC de l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de la souche Pm11 (fractions des pics 1, 2, 3, 4, 5 et 6) contre la souche MRSA 639c.

## 2. Analyse par HPLC de l'extrait méthanolique du mycélium

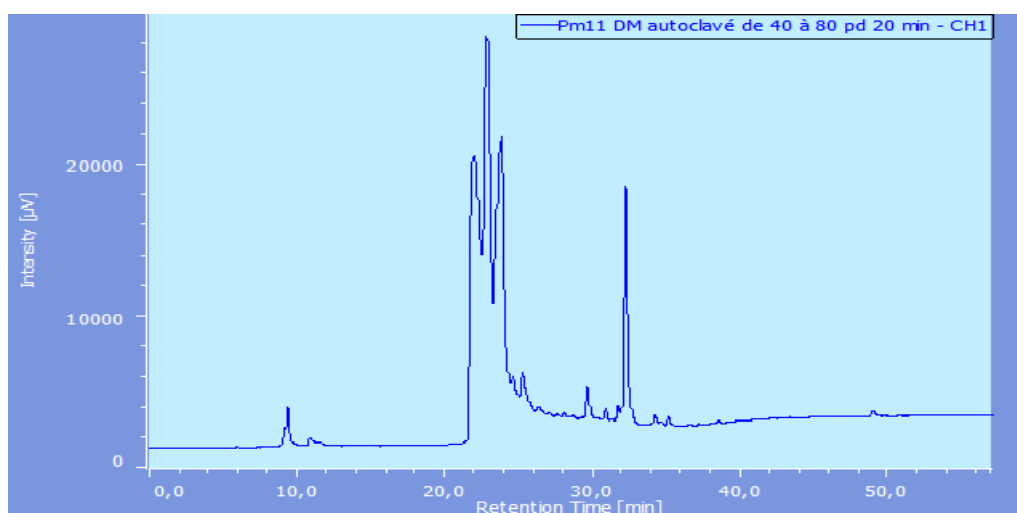
Les composés antibactériens de la souche Pm11 sont produits dans le milieu de culture; et à l'intérieur du mycélium. Selon des résultats des expériences précédentes qui ont révélé la présence d'une activité antibactérienne intéressante dans l'extrait méthanolique du mycélium de la souche Pm11 (20mm), afin de confirmer ces résultats une analyse par HPLC a été effectuée. La [Figure 19](#) illustre la présence de plusieurs pics, certain d'entre eux sont les mêmes pics présents dans l'extrait au dichlorométhane tel que les pics 4, 5, et avec les mêmes temps de rétention ([voir Figure 17\(A\)](#)), mais avec l'apparition d'un nouveau groupe de pics (groupe X) avec des temps de rétention allant de 10 à 13.8 min.



**Figure 19.** Profil du chromatogramme de l'extrait méthanolique du mycélium de la souche Pm11 solubilisé dans du méthanol (colonne waters C18, gradient méthanol-eau, débit: 1 mL/min; détection: 220 nm).

### 3. Etude de la stabilité de l'activité antibactérienne à la température

Un volume de 1 mL de l'extrait actif du dichlorométhane de la souche Pm11 a été soumis à un traitement par la température: 120 °C pendant 20 min, ensuite testé par la méthode des disques de papier et l'activité a été comparée à celle obtenue avec l'extrait sans traitement. Les résultats sont illustrés dans la [Figure 20](#). Selon ces résultats, on peut constater que l'activité antibactérienne est maintenue stable à l'action de la température.



**Figure 20.** Profil chromatographique de l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de la souche Pm11 après traitement à chaleur humide (120 °C pendant 20 min; conditions HPLC: colonne waters C18, gradient méthanol-eau, débit: 1 mL/min; détection: 220 nm).



L'analyse par HPLC a permis de séparer l'extrait au dichlorométhane du filtrat de culture de la souche Pm11 en 6 fractions, qui ont montré une activité antibactérienne intéressante contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline, qui a été à l'origine de graves préoccupations de la santé publique d'une part et en raison du choix limité d'antibiotiques pour le traitement efficace des infections causées par cette bactérie d'autre part. De cela, La découverte de nouveaux antibiotiques actifs contre SARM devient primordiale.

Ce genre est connu pour produire un nombre limité d'antibiotiques, comme la sporangiomycine sécrétée par *P. parontospora* subsp. *antibiotica* JCM 3094<sup>T</sup> (Thiemann *et al.*, 1968a), le thiostrepton élaboré par *P. sphaerica* JCM 9374<sup>T</sup> (Mertz, 1994) et la planosporicine produite par *Planomonospora* sp. DSM 14920<sup>T</sup> et *P. alba* NRRL 18924<sup>T</sup> (Castiglione *et al.*, 2007; Sherwood *et al.*, 2013) qui sont tous de nature peptidique; ce sont en fait des lantibiotiques.

La production d'antibiotiques chez les membres de la famille des *Streptosporangiaceae*, auquel appartient le genre *Planomonospora*, est estimée à environ 6 % des souches appartenant à des genres rares (Lazzarini *et al.*, 2000).

L'analyse par HPLC a montré la présence de 5 pics obtenue à partir du filtrat de culture extraite au dichlorométhane, qui s'est avéré qu'ils sont tous actifs contre les SARM testés, cela peu signifier la présence de 5 composés antibactériens différents que ceux déjà connus et secrétés par les espèces de ce genre.

Le test effectué de la stabilité à la température des composés antibactériens, montre que ces derniers sont thermorésistants. Une future confirmation après la purification finale de ces composés, sera nécessaire.

Les deux souches Pm1 et Pm11 de *Planomonospora* sp. ont montré une activité intéressante contre *S.aureus* résistant à la méthicilline, ce qui encourage à effectuer des études complémentaires concernant la purification, la caractérisation et l'identification des métabolites secondaires actifs de ces souches.

Les résultats obtenus à travers cette étude préliminaire, contribueront à l'ouverture d'une nouvelle fenêtre sur le potentiel antibiotique du genre *Planomonospora*. Cela rend compte également à l'importance des sols sahariens algériens comme source d'actinobactéries potentiellement productrices de nouvelles substances actives contre les bactéries multi-résistantes.

**CONCLUSION  
ET  
PERSPECTIVES**

La résistance microbienne aux composés actifs constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent antimicrobien pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure.

Pour ces raisons, plusieurs stratégies dans le monde ont été mises en place pour la recherche de nouveaux antibiotiques naturels à partir des microorganismes. Parmi ces stratégies, on peut souligner les recherches orientées vers des actinobactéries appartenant au genre *Streptomyces* ou à des genres peu fréquents à rares, et provenant d'environnements peu communs voir extrêmes.

Dans ce présent travail, qui rentre dans le cadre d'une des thématiques du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure de Kouba, qui s'intéresse à la recherche des actinobactéries rares issues des sols sahariens d'Algérie du point de vue taxonomique, écologique, et production et identification de produits bioactifs, nous nous sommes intéressés à l'étude de l'activité antibactérienne de quelques souches appartenant au genre *Planomonospora* sp. isolées de sols issus de 3 régions sahariennes: Adrar, Béchar et Hoggar.

L'étude du pouvoir antagoniste des 17 souches de *Planomonospora* sp. a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar basée sur la mise en évidence de l'activité antibiotique des souches sur deux milieux solides (Bennett et HTA) contre diverse souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (MRSA 3, MRSA 639c, *S.aureus* ATCC 43300, *S.aureus* ATCC 29213).

Les résultats ont révélé un potentiel important des souches à produire des molécules bioactives, dont 70.6% ont montré une activité antibactérienne moyenne à forte contre les germes cibles.

Deux souches désignées Pm1 et Pm11, ont montré une forte activité antibactérienne, pour cette raison, ces deux souches ont fait l'objet d'une cinétique de croissance, de pH et de production de composés antibactériens sur le milieu complexe liquide Bennett à 30 °C et mené en conditions d'agitation permanente à 250 rpm pendant 10 jours.

La production maximale des antibiotiques est obtenue à la fin de la phase exponentielle pour les deux souches sélectionnées.

## Conclusion et perspectives

---

Les composés antibactériens sécrétés par les souches Pm1, Pm11 de *Planomonospora* sp. ont été mis en évidence dans le filtrat de culture et dans le mycélium, ceux présents dans le filtrat de culture sont extraites par l'acétate d'éthyle pour la souche Pm1, et par le dichlorométhane pour la souche Pm11.

La purification des composés antibactériens de la souche Pm11 de *Planomonospora* sp. a été réalisée par HPLC. Cette purification a permis de mettre en évidence la présence de plusieurs pics. Les fractions des pics 2 et 6 présentent une forte activité, une activité aussi importante comparativement avec celle des pics 2 et 6 est représenté par les deux fractions des pics 4 et 5. Tandis que les deux pics 1 et 3 montrent une activité très faible contre MRSA 639c. Cela peu signifie la présence de 5 composés antibactériens secrété par la souche Pm11.

Le travail effectué ouvre des perspectives multiples qui concernent:

- La recherche continue de nouvelles espèces ou souches d'actinobactéries rares appartenant aux genres *Planomonospora* en améliorant les méthodes de sélection et en diversifiant les sols et les écosystèmes sahariens.

- La poursuite de la recherche des antibiotiques sécrétés par les souches du genre *Planomonospora* et l'optimisation de la production de ces derniers en milieu liquide, par la recherche des meilleures conditions (sources de carbone et de l'azote, éléments minéraux, aération, pH, etc.).

- La recherche des activités biologiques autre qu'antibiotique des souches de *Planomonospora* telles que l'activité antifongique.

- La purification des composés antibactériens et la détermination de leur structure chimique après études spectroscopiques.

- La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) de chaque antibiotique purifié contre les bactéries multi-résistantes.

- la réalisation de certains tests complémentaires tels que la toxicité, la solubilité, la stabilité, etc.

## **REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES**

## Références bibliographiques

---

### Références bibliographiques

#### A

- Aouati H.** (2009). Isolement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthicilline. Etude de leur sensibilité aux autres familles d'antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie appliquée et Biotechnologies microbiennes, Université Mentouri. Constantine.
- 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. 127p.
- Aouiche A.** (2013). Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigène pour l'Homme. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.p 159.
- Arasu. M. V, Duraipandiyam. V, Agastian. P, Ignacimuthu. S.** (2009). In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). Journal de Mycologie Médicale. Vol: 19. N° 1. Pp: 22-28.
- Asselineau J. et Zalta P.** (1973). Les antibiotiques. Structure et exemples de mode d'action. Hermann Ed. Paris.

#### B

- Badis A.** (1992). Les actinomycètes du sol de la Mitidja: détermination des espèces, distribution écologique et aptitude à la dégradation des acides humiques. Thèse de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. 173p.
- Badji B.** (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.
- Becker B., Lechevalier P. P., Gordon R. E. et Lechevalier H. A.,** (1964). Rapid differentiation between *Nocardia* and *Streptomyces* by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. *Appl. Microbiol.*, 12, 421-423.
- Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E. and Lechevalier H. A.,** (1965). chemical composition of cell-wall preparations from strains of various from genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*, 13, 236-242.
- Becking J.H.** (1974). Family III. *Frankiaceae*. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8th Eds. Buchanan R.E. and Gibbons N.E. (Eds.). Williams and Wilkins Co. Baltimore. pp. 701-706.

## Références bibliographiques

---

- Belyagoubi L.** (2014). Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens. Thèse de Doctorat en Biologie, option Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse, Université Aboubakr Belkaïd-Tlemcen.
- Belghit S.** (2010). Recherche dans les sols sahariens algériens d'actinomycètes producteurs de molécules actives contre *Candida albicans*. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS de Kouba, Alger. 94 p.
- Berdy J.** (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.*, 58 (1): 1-26.
- Berdy J., Aaszalos A. and Mc Nitt K. L.** (1987). CRC Handbook of antibiotic compounds. Vol. XIII. Microbial metabolites. part 1, 2, 3. Florida, USA. CRC Press, Boca Raton.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology 2nd Edition. Volume 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. 1750 p.
- Bhathena Z. P., Vora C., Kadam K.** (2002). Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycetale consortium. *Pollution Research*, 21(3), 265-275.
- Boakes S., Cortes J., Appleyard A.N., Rudd B.A., Dawson M.J.** (2009). Organization of the genes encoding the biosynthesis of actagardine and engineering of a variant generation system. *Mol. Microbiol.*, 72:1126– 1136.
- Boubetra D.** (2013). Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198 Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach, Alger. 154 p.
- Boucheffa K.** (2011). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques: Identification des souches productrices et Essai de caractérisation des antifongiques produits.
- Boudjella H.** (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. 177 p.
- Boudjella H.** (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques sécrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach. 188 p.
- Bouras N.** (2005). Régulation de la production d'antibiotiques dithiolopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 121 p.

## Références bibliographiques

---

**Bouti K.** (1997). Les genres rares *Planomonospora*, *Planobispora*, *Spirillospora* et *Streptosporangium* (*Actinomycetales*) dans les sols sahariens; taxonomie numérique et étude de quelques uns de leurs antibiotiques. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba. Alger. 149 p.

### C

**Cassell G. H. and Mekalanos J.** (2001). Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *Jama.*, 285(5): 601-5.

**Castiglione F., Cavaletti L., Losi D., Lazzarini A., Carrano L., Feroggio M., Ciciliato I., Corti E., Candiani G., Marinelli F. and Selva E.** (2007). A novel lantibiotic acting on bacterial cell wall synthesis produced by the uncommon actinomycete *Planomonospora* sp. *Biochemistry.*, 46:5884–5895.

**Centers for Disease Control and Prevention.** (1997). *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin- United States. Morbid Mortal weekly Rep. 46.765: 76.

**Chaabane Chaouch F.** (2014). Taxonomie et propriétés antagonistes de quelques souches de *Planomonospora* et de *Streptosporangium* isolées des sols sahariens. Mémoire de Magister en Microbiologie, option microbiologie appliquée, E.N.S. de Kouba. 99p.

**Chargaff E.** (1950). Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, 6: 201 -209.

**Chun, J., Seang, C.N., Lee, K. J., Kang, S.A., Goodfellow, M., Hah V.C.** (1997). *Nocardia flavorosea* sp. Nov. *Inter J Syst Bacteriol*, 48(Pt 3): 901–905.

**Chorin A.C.** (2009). Synthèse enzymatique de nouveaux dérivés dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de doctorat, option Génie des procédés environnementaux, l'université de Toulouse.

**Coates. A; and Hu. Y.** (2007). Novel approaches to developing new antibiotics for bacterial infections. *Brit. J. Pharmacol.* 152 : 1147–1154.

**Colombié V.** (2005). Description de la production de spiramycine par *Streptomyces ambofaciens*. Modélisation métabolique, simulation et capteur logiciel. Thèse de Doctorat, Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse. pp174.

### D

**Davido B.** (2010). Etude de la prise en charge ambulatoire des infections cutanées communautaires à staphylocoque doré. Thèse de doctorat, université Denis Diderot. p56.

**Demain, A.L., Solomon N.A.** (1986). Biology of industrial microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc.

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



## Références bibliographiques

---

**Demain, A. L. et R. P. Elander.** (1999). The Beta-lactam antibiotics: past, present, and future. *Antony Van Leeuwenhoek*. 75: 5-19.

**Domergues Y. and Mangenot F.** (1970). Ecologie microbienne du sol. *Masson et Cie, Paris*. 796 p.

**Driche E.** (2010). Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 121 p.

**Dumenil G. et Sanglier J.J.** (1989). Physiologie de la production des antibiotiques. *In: Biotechnologie des antibiotiques* (Larpent J.P. & Sanglier J.J., Eds) Masson, Paris,

### É

**Ensign J.C., Normand P., Burden J.P. and Yallop C.A.** (1993). Physiology of some actinomycetes genera. *Res. Microbiol.*, 144 (8): 657-660.

**Escalante L., Gonzalez R., Obregon A. M. and Sanchez S.** (1992). Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *J. Antibiot.*, 45: 465-469.

**Euzéby J. P.** (2002). Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 2001. *Revue Méd. Vét.*, 153: 5-14.

### F

**Foster, T.** (1996). *Staphylococcus*. *In: S. Baron, Editor. Medical Microbiology*. 4th edition. Galveston (TX). University of Texas Medical Branch at Galveston.

### G

**Goodfellow, M. and Williams, S.T.** (1983). Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology.*, 37, 189–216

**Goodfellow M., Stanton L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E.** (1990). Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 19-36.

**Goodfellow M.** (2012). Actinobacteria phyl. nov. *In: Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.i., Parte A* (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*. Vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. p. 33.

### H

**Hacène H., Sabaou N., Bounaga N. and Lefebvre G.** (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios*.

**Hamedi J., Mohammadipanah F., Jan M. V., Pötter G., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P. and Kroppenstedt R. M.** (2010). *Nocardiopsis sinuspersici* sp. nov., isolated from sandy rhizospheric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60 (10): 1770-1774.

## Références bibliographiques

---

**Hiramatsu K, Aritaka N, Hanaki H, et al.** (1997). Dissemination in Japanese hospitals of strains of *Staphylococcus aureus* heterogeneously resistant to vancomycin. *Lancet*; 350: 1670–3.

**Harris, L. G, S. J. Foster et R. G. Richards.** (2002). An introduction to *Staphylococcus aureus*, and techniques for identifying and quantifying *S. aureus* adhesins in relation to adhesion to biomaterials: review. *Eur. Cells Mater.* 4: 39-60.

**Hayakawa M. and Nonomura H.** (1987). Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology.*, 65 (5): 501-509.

**Holt J.G., Kreig N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T. and Williams S.T.** (1994). In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9th edition. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

**Holzapfel W., Brost I, Faerber P., Geisen R., Bresch H., Jany K.-D., Mengu M., Jakobsen M., Steyn P.S., Teniola D. and Addo P.** (2002). Bacterial degradation of aflatoxin B1, ochratoxin A and/or zearalenone. *PCT. Int.*

### I

**Igarashi Y., Ogura H., Furihata K., Oku N., Indananda C. and Thamchaipenet A.** (2011). Maklamicin, an antibacterial polyketide from an endophytic *Micromonospora* sp. *J. Nat. Prod.*, 74 (4): 670-674.

**Ishizawa S. and Araragi M.** (1976). Composition of actinomycetes population in soil. In: Actinomycetes, the boundary microorganisms. Arai T. (Ed.) Toppan Co. Ltd, Tokyo, 97-107.

### J

**Jorgensen J.** (1991). Mechanisms of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* and methods for laboratory detection. *Infect Control Hosp Epidemiol.* p219.

### K

**Khamna S., Yokota A. and Lumyong S.** (2009). Actinomycetes isolated from medicinal plant rhizosphere soils: diversity and screening of antifungal compounds, indole-3-acetic acid and siderophore production. *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 25 (4): 649-655.

**Kong, K-F., L. Schneper et K. Mathee.** (2010). Beta-lactam antibiotics: from antibiosis to resistance and bacteriology. *APMIS* 118: 1-36.

**Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. and Goodfellow M.** (1990). Taxonomic revision of the actinomycete genera *Actinomadura* and *Microtetraspora*. *J. Syst. Appl. Bact. Microbiol.*, 13: 148-160.

### L

**Lacey, J.** (1997). Actinomycetes in composts. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine.*, 4, 113–121.

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

## Références bibliographiques

---

- Lamari L.** (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 186 p.
- Larpent J.P. et Sanglier J.J.** (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Masson, Paris, p. 481.
- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F.** (2000). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 79, 399–405.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A.,** (1970<sub>a</sub>). Composition of whole-celle hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes, *In : The Actinomycetales*. Prauser H. (Eds) G. Fisher Verlag, Jena, 311-316.
- Lechevalier H. A. and Lechevalier M. P.,** (1970<sub>b</sub>). A critical evaluation of genera of aerobic actinomycetes. *In : The Actinomycetales*. Prauser h. (Eds). G. Fisher Verlag, Jena, 393-405.
- Lechevalier M.P., De .C. and Lechevalier H.A.** (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, 5, 249-260.
- Li X., Daniel J. and O'Sullivan J.** (2012). Contribution of the Actinobacteria to the growing diversity of lantibiotics. *Biotechnol Lett.*, 34:2133–2145.
- Liese Iyamba.J-M.** (2012). Etude de l'interaction des souches cliniques de *Staphylococcus aureus* avec une surface abiotique. Thèse de doctorat, université libre de Bruxelles. p 131.
- Lombardi P. and Crisanti A.** (1997). Antimalarial activity of synthetic analogues of distamycin. *Pharmacol. Ther.*, 76, 125-133.
- Loria A.** (1986). The national institute of health quality control program. III. Fllox-up studies *Rev. Invest. Clin.* p435-440.
- Loucif L.** (2006). Recherche des souches d'actinomycètes productrices des molécules antibactériennes cas des eaux du lac « oubeira d'el kala ». *Magister en Microbiologie*. Université Badji Mokhtar – Annaba.
- Lowy, F. D.** (2003). Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J. Clin. Invest.* 111: 1265-1273.

## M

- Meklat A.** (2012). Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat, E.N.S Kouba, Alger. 162 p.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F. and Ahmed Lebrihi.** (2011). Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in saharan soils of Algeria. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Mertz F.P.** (1994). *Planomonospora alba* sp-nov and *Planomonospora sphaerica* sp-nov, 2 new species isolated from soil by baiting techniques. *Int J Syst Bacteriol.*, 44 (2): 274-281.

## Références bibliographiques

---

**Merrouche R., Bouras N., Coppel Y., Mathieu F., Monje M. C., Sabaou N. and Lebrihi A.** (2010). Dithiopyrrolone antibiotic formation induced by adding valeric acid to the culture broth of *Saccharothrix algeriensis*. *J. Nat. Products.*, 73 (6): 1164-1166.

**Messaoudi O.** (2013). Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Béchar).Mémoire de Magister, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. P64.

### N

**Nolan R. D. and Cross T.** (1988). Isolation and screening of actinomycetes, *In: Actinomycetes in biotechnology.* Goodfellow M., Williams S. T. and Mordarski M. (Eds). Academic Press, Inc.,San Diego, Calif. pp. 1-32.

### O

**Omura, S.** (1992). The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.

**Otto, M.** (2012). Staphylococcal infections: mechanisms of biofilm maturation and detachment as critical determinant of pathogenicity. *Annu. Rev. Med.* 64: 1-14.

**Ottow, J.C.G., Glathe, H.** (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Microbiol.*

### P

**Peric-Concha, N. and Long, P.F.** (2003). Mining the microbial metabolome: a new frontier for natural product lead discovery. *Drug Discov Today.*

**Pfefferle C., Theobald U., Gurtler H. and Fiedler H. P.** (2000). Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.*, 80 (2): 135-142.

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

### R

**Räty K., Kantola A., Hakala J., Ylihonko K. and Mantsala P.** (2002). Cloning and characterization of *Streptomyces galilaeus* aclacinomycins polyketide synthase (PKS) cluster. *Gene*, 293, 115-122.

**Rebiahi S.A.** (2012). Caractérisation de souches de *Staphylococcus aureus* et étude de leur antibioresistance au niveau du centre hospitalo. Thèse de doctorat, universitaire de Tlemcen. p117.

### S

## Références bibliographiques

---

- Sabaou N.** (1988). Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger.192p.
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. and Bounaga N.** (1992). Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can J Microbiol.*, 38:1066–1073.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. and Bennadji H.** (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse.*, 9(2):147–153.
- Sanglier, J.J., Trujill M.,** (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol*, 12(3): 269–276.
- Schwarz S., Kehrenberg C. and Walsh T.R.** (2001). Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. *Int. J. Antimicrob. Agents*, 17, 431-437.
- Sherwood E.J. and Bibb M.J.** (2013). The antibiotic planosporicin coordinates its own production in the actinomycete *Planomonospora alba*. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 110(27): 2500–2509.
- Sherwood E.J., Hesketh A.R. and Bibb M.J.** (2013). Cloning and analysis of the planosporicin lantibiotic biosynthetic gene cluster of *Planomonospora alba*. *J Bacteriol.*, 195(10): 2309–2321.
- Smaoui S.** (2010). Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de doctorat, université de Toulouse.p 182.
- Sneath P.H.A.** (1957). The application of computers to taxonomy. *J.Gen. Microbiol.* 17: 201-226.
- Solanki R., Khanna M. and Lal R.** (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Ind. 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.
- Song. Q, Huang. Y & Yang. H.** (2012). Optimization of Fermentation Conditions for Antibiotic Production by Actinomycetes YJ1 Strain against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Journal of Agricultural Science*; Vol. 4, No. 7. Pp : 95-102.
- Sperber, W. H. et S. R. Tatini.** (1975). Interpretation of tube coagulase test for identification of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 29: 502-505.
- Stackebrandt E., Winner-Fussl B., Fowler V.J. and Schillfer K.H.** (1981a). Deoxyribonucleic acid homologies and ribosomal ribonucleic acid similarities among spore forming members of the order *Actinomycetales*. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 31: 420-431.

## Références bibliographiques

---

**Stackebrandt E., Ludwig W., Seewaldt E. and Schleifer K.H.** (1983). Phylogeny of sporeforming members of the order *Actinomyetales*. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 129 (6): 1831-1838.

**Stackebrandt E. and Goebel B. M.** (1994). Taxonomic note: A place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology.*, 44: 846-849.

**Strub C.** (2008). Modélisation et optimisation de la production de thiolutine chez *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Toulouse, France. 203 p.

**Sujatha P., Bapi-Raju K. V. V. S. N. and Ramana T.** (2005). Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillinresistant *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Res.* 160: 119-126.

**Suzuki S.I., Okuda T. and Komatsubara S.** (2001a). Selective isolation and distribution of the genus *Planomonospora* in soils. *Can. J. Microbiol.*, 47, 253-263.

**Suzuki S.I., Okuda T. and Komatsubara S.** (2001b). Selective isolation and study on the global distribution of the genus *Planobispora* in soils. *Can. J. Microbiol.*, 47, 979-986.

### T

**Theilleux, J. In Levreau, J.Y., Bouix, M.** (1993). Microbiologie industrielle. Les microorganismes d'intérêt industriel. Lavoisier, Paris. Ch: 6 : 425-481. Technique et documentation. Lavoisier. Paris.

**Thiemann J.E., Pagani H. and Beretta G.** (1967). A new genus of the *Actinoplanaceae*: *Planomonospora* gen. nov. *G. Microbiol.*, 15: 27-38.

**Thiemann J.E., Coronell C., Pagani H., Beretta G., Tamoni G. and Arioli V.** (1968a). Antibiotic production by new form-genera of *Actinomycetales*. I. Sporangiomycin, an antibacterial agent isolated from *Planomonospora parontospora* var. *antibiotica* var. nov. *J. Antibiot.*, 21: 525-531.

**Thiemann J.E.** (1970). Study of some new genera and species of the *Actinoplanaceae*. In: *The Actinomycetales*. Prosser H. (Ed.). VEBG. Fisher Verlag, Jena., p247.

**Tighidet S.** (2011). Caractérisation d'antifongiques non polyéniques produits par des souches d'actinomycètes et essai d'optimisation de leurs milieux de production. Mémoire de Magister, Université Abderrahmane Mira Bejaia. p79.

**Tipper, D. J. et J. L. Strominger.** (1965). Mechanism of action of penicillins: a proposal based on their structural similarity to acyl D-alanyl-alanine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 54: 1133-1141.

## Références bibliographiques

---

**Toumatia O.** (2010). Actinomycetes sahariens producteurs d'antifongiques: isolement, taxonomie, caractérisation des antibiotiques et essais de lutte contre les maladies de plantes. Magister de Microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 115 p.

**Tsuboya S., Takayuki D., Takenori I. and Kenji H.** (1996). Substance P antagonists manufacture with microorganism. *Jpn. Kokai Tokkyo Koho.*, 16.

U

**Utsui, Y. et T. Yokota.** (1985). Role of an altered penicillin-binding protein in methicillin-and cephem-resistant *Staphylococcus aureus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 28: 397-403.

V

**Vandamme E.J.** (1985). Biotechnology of industrial antibiotics. Drugs and pharmaceutical sciences., vol 22. Marcel Dekker. New York. 832 p.

**Vincenot, F., M. Saleh et G. Prévost.** (2008). Les facteurs de virulence de *Staphylococcus aureus*. *Rev. Fr. Labo.* 407: 61-69.

**Vobis G.** (1989). Genus *Planobispora* Thiemann and Beretta. In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol. 4. Williams S.T., Sharpe M.E. and Holt J.G. (Eds.). Williams and Wilkins Co., Baltimore, pp. 2536-2538.

W

**Wayne L.G., Brenner D.J., Colwell R.R., Grimont P.A.D., Kandler O., Krichevsky M.I., Moore L.H., Moore W.E.C., Murray R.G.E., Stackebrandt E., Starr M.P. and Truper H.G.** (1987). International committee on systematic bacteriology. Report of the ad hoc committee on the reconciliation of approaches to bacterial systematic. *Int J Syst Bacteriol.*, p.464.

**Waksman, S.A., Henrici, A.T.** (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol*, p.341.

**Waksman S.A.** (1959). The actinomycetes: nature, occurrence and activities, Williams and Wilkins. Company, Baltimore. 1, 29-46.

**Waksman S.A.** (1961). The actinomycetes. Classification, identification and descriptions of genera and species. Vol.2. The Williams and Wilkins Co. Baltimore, pp. 1-363.

**Ward-Rainey N.L., Rainey F.A. and Stackebrandt E.** (1997). In Stackebrandt, E., F.A. Rainey and N.L. Ward-Rainey. Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 47: 479-491.

**Warren H.B., Prokop J.F. and Grundy W.E.** (1955). Non-synthetic media for antibiotic producing actinomycetes. *Antib. Chemother.*, 5, 6-12.

**Williams S.T., Lanning S. and Wellington E.M.H.** (1984). Ecology of Actinomycetes. In: The Biology of the Actinomycetes. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski et S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481-528.

## Références bibliographiques

---

**Williams, S. T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, D. I., Kuznetsov, V. D., Le Monnier, F. J., Long, P. F., Maycroft, K. A., Palma, R. A., Petrolini, B., Quaroni, S., Todd, J. I., and West, M.** (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Res Microbiol*; p.656.

### Z

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

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

**Zhang L. P., Zhang L. M. and Zhang X. M.** (2009). *Streptosporangium canum* sp. nov., isolated from soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*

**Zhu H., Guo J., Yao Q., Yang S., Deng M., Phuong L. T. B., Hanh V. T. and Ryan M. J.** (2007). *Streptomyces vietnamensis* sp. nov., a streptomycete with violet–blue diffusible pigment isolated from soil in Vietnam. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57 (8): 1770-1774.

**Zitouni A.** (2005). Taxonomie et antibiotiques des *Saccharothrix* et des *Nocardiopsis* des sols sahariens et nouvelles molécules bioactives sécrétées par *Saccharothrix* sp. SA 103. Thèse de Doctorat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou, 230 p.



# **ANNEXES**

### ANNEXE N° 1

#### COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE

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

Chitine: 2 g; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>: 0,35 g; KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>: 0,15 g; MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,2 g; NaCl: 0,3 g, CaCO<sub>3</sub>: 0,02 g; FeSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 10 mg; ZnSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 1 mg; MnCl<sub>2</sub>, 4H<sub>2</sub>O: 1 mg; agar: 18 g; eau distillée, q.s.p. 1000 mL; pH 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés:

- Les vitamines: thiamine-HCl, riboflavine, niacine, pyridoxine-HCl, inositol, panthoténate de calcium: à raison de 0,5 mg/L et biotine: 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées à l'éther puis dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.
- Une solution stérile d'un antifongique, l'actidione (le cycloheximide) à 80 mg/L.
- Une solution stérile pour chaque agent sélectif: le lysozyme (50, 100 et 500 mg/L), lapolymyxine (25 mg/L) et la pénicilline (25 mg/L).

##### **Milieu Bennett** (Warren *et al.*, 1955)

Glucose: 10 g; peptone: 2 g; extrait de levure: 1 g; extrait de viande: 1 g; agar: 12 g; eau distillée: 1000 mL; pH 7,3.

##### **"HTA"(Hickey-Tresner-Agar)** (Waksman, 1961)

Dextrine: 10 g; Extrait de levure: 1 g; Extrait de viande: 1 g; peptone: 2 g; CaCl<sub>2</sub>, 7H<sub>2</sub>O: 0,02g; Agar: 20 g; Eau distillée 1000 mL. pH 7,3.

##### **Gélose nutritive (GN)**

Peptone: 10 g; Extrait de levure 5 g; NaCl 5 g; Agar 15-20 g; Eau 1000 mL; pH 7,2

**ANNEXE N°2**

**ACTIVITES ANTIBACTERIENNES LORS DES CINETIQUES ET**

**ECARTS-TYPES**

Jours-souche		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Pm1	Biomasse	0.6 ±0.53	0.97 ±0.41	1.23 ±0.43	1.47 ±0.35	3.12 ±0.5	3.42 ±0.16	2.87 ±0.14	3.1 ±0.53	2.78 ±0.2	2.33 ±0.31	2.5 ±0.05
	pH	7 ±0.52	6.3 ±0.15	5.2 ±0.72	5.3 ±0.55	4.8 ±0.38	4.8 ±0.72	5.5 ±0.26	5.2 ±0.76	6.2 ±0.96	5.5 ±0.25	6.3 ±0.25
	MRSA 639c	0 ±0	15.33 ±0.58	21.33 ±0.58	23.33 ±0.58	23.67 ±1.53	23.33 ±1.15	22.33 ±1.15	17.33 ±1.15	16.33 ±1.5	14.33 ±2.31	14.67 ±1.53
	<i>S.aureus</i> ATCC29213	0 ±0	0 ±0	19.67 ±1.53	22.33 ±1.53	22 ±2	21.67 ±1.15	21.33 ±2.08	18.33 ±0.58	18 ±1	16.33 ±0.58	15.67 ±1.15
	<i>S.aureus</i> ATCC43300	0 ±0	0 ±0	16.33 ±1.53	18.33 ±0.58	19 ±1.73	18.33 ±1.53	17 ±1.73	17.33 ±2.08	16.33 ±0.58	15.67 ±1.15	15.33 ±1.15
Pm11	Biomasse	1.48 ±0.43	3.23 ±0.77	3.23 ±0.2	3.77 ±0.6	3.93 ±0.69	4.08 ±0.63	3.8 ±0.74	3.98 ±0.49	3.67 ±0.28	3.83 ±0.53	3.32 ±0.06
	pH	7.2 ±0.2	6.2 ±0.35	5.3 ±0.1	4.87 ±0.15	4.53 ±0.06	4.33 ±0.06	5.47 ±0.47	5.53 ±0.42	5.8 ±0.4	6.03 ±0.5	7 ±0.2
	MRSA 639c	0 ±0	19 ±1.73	24.67 ±1	25 ±1.53	22.33 ±1.53	22 ±1.73	21.67 ±2.08	20.67 ±2.89	21 ±2	21 ±2	21.67 ±2.08
	<i>S.aureus</i> ATCC29213	0 ±0	18 ±0	22 ±1.15	22.67 ±0	22.33 ±0.58	22.67 ±2.08	22 ±1.73	21 ±2	21 ±1	21 ±1.73	21.67 ±1.53
	<i>S.aureus</i> ATCC43300	0 ±0	19.33 ±1.15	26 ±1.15	26.33 ±1	25.67 ±2.31	25 ±2.65	24.67 ±2.08	26 ±2	26.33 ±2.52	25.67 ±3.06	25.67 ±3.06