



MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

**PRESENTE POUR L'OBTENTION DU DIPLOME DE MASTER EN
SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
OPTION : MICROBIOLOGIE**

Réalisé au laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), ENS de Kouba

Par

BOULALLA Soumia et CHANANE Yousra

Master domicilié au Laboratoire de Biotechnologie, Environnement et Santé, Blida

Thème

**Recherche des souches de *Streptomyces* antagonistes de
Staphylococcus aureus dans les sédiments marins du littoral
algérien**

Soutenu le 02/07/2018

Devant le jury composé de:

M ^{me} AIT SAADI N.	M.A.A Université de Blida 1	Présidente
M ^{me} BOUDJEMA N.	M.C.B Université de Blida 1	Examinatrice
M ^{me} MEKLAT A.	M.C.A Université de Blida 1	Promotrice
M ^{me} SAKER R.	M.C.B Université d'Alger 1	Co-promotrice

Remerciements

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba. Le bon déroulement de ce travail n'aurait pu être fait sans la contribution et l'aide des personnes travaillant au LBSM. Nous tenons chaleureusement à les remercier de leurs disponibilités.

Au **Pr. SABAOU Nasseridine**, directeur de laboratoire LBSM de Kouba, nous le remercions pour la confiance qu'il nous a accordée en nous accueillant et pour avoir mis à notre disposition le matériel nécessaire pour la réalisation de notre travail. Sa gentillesse, sa disponibilité et de son aide lors de l'identification morphologique des actinobactéries était pour nous une forme de générosité sans égale. Veuillez trouver ici, l'expression de notre profond respect.

A notre promotrice **Dr. MEKLAT Atika** notre main lucrative pour ses aides, sa disponibilité et ses conseils. Nous avons eu le privilège d'être parmi son équipe, nous avons apprécié ces qualités et ces valeurs et sa sérénité. Nous avons apprécié sa compétence et son sens de responsabilité qui nous ont énormément marquées. Par voie de conséquence, veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines. Ce travail est pour nous l'occasion de vous témoigner notre profonde gratitude.

Au **Dr. SAKER Rafika** notre co-promotrice, nous tenons à la remercier chaleureusement pour nous avoir consacré le temps et pour nous avoir guidées et orientées pour la réalisation de ce travail.

Nos sincères remerciements aux membres de jury :

Nous remercions **M^{me} AIT SAADI Nacera.**, MAA à l'Université Saâd Dahleb de Blida, pour l'honneur que vous nous avez fait en acceptant de présider ce jury et pour vos qualités d'enseignante qui nous ont marqué tout au long de notre cursus. Veuillez trouver ici, l'expression de notre reconnaissance et de notre respect le plus sincère.

Nous remercions **Dr. BOUDJEMA Nouara.**, MCB à l'Université Saâd Dahleb de Blida, qui nous a fait l'honneur d'avoir accepté d'examiner ce travail. Nous la remercions également pour la qualité de son enseignement qui nous a fait aimer le module de microbiologie alimentaire.

Nos remerciements s'adressent également au **Dr. BOUZNADA Khaoula** pour son aide lors des prises des micrographies et à **M^{me} KACI Sonia**, ingénieur de laboratoire LBSM, pour sa disponibilité. A tous les membres du laboratoire LBSM, pour leur disponibilité, leurs conseils scientifiques et leur sympathie, leurs encouragements ainsi que pour l'ambiance agréable tout au long de ce stage.

Dédicace

Je dédie ce mémoire

A mes très chers parents, **Mustapha** et **Amina**

Aucune dédicace ne saurait exprimer mon respect, mon amour éternel et ma considération pour les sacrifices que vous avez consentis pour mon instruction et mon bien être. Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos vœux tant formulés, le fruit de vos innombrables, je demande à dieu de vous protéger et de vous réserver une longue vie.

A mes grand mères maternels et paternels qui m'ont soutenue et encourager durant tout le parcours universitaire.

A mes chers et adorable **sœurs**, à mon **Abdellah** et oncle **Hamza** qui m'ont soutenue et aider à surmonté toutes les difficultés que j'ai rencontrées durant mon cursus.

Aux **parents** de mon binôme ainsi que sa sœur **Yakout** pour leurs encouragements, leurs gentillesse et patiences durant toute cette période.

A mon binôme **Soumia** avec laquelle j'ai passé une merveilleuse année que je n'oublie jamais, en témoignage de l'amitié qui nous unit et des souvenirs de tous les moments que nous avons passés ensemble, je vous dédie ce travail et je vous souhaite une vie pleine de santé de bonheur et de réussite.

Yousra

Dédicace

Je dédie affectueusement ce mémoire de fin d'étude

A ma **Chère mère** qui peut être fier de trouver ici le fruit du résultat de longues années de sacrifices, ses conseils, son amour et son esprit était toujours avec moi pour me soutenir malgré son absence, que dieu bénie son âme. Merci pour les valeurs nobles, l'amour et l'éducation que j'ai reçu de toi.

A mon **Chère père** qui a œuvré pour ma réussite, de par son affections, son soutien, ces sacrifices consentis et ces précieux conseils, pour toute son assistance et sa présence dans ma vie, veuillez recevoir à travers ce travail aussi modeste soit-il, l'expression de mes sentiments et de mon éternelle gratitude.

Je dédie ce travail également à toutes mes sœurs et mes frères : **Zola, Yakout, Siham, Kenza, Faiza, Ahmed** et mon très cher frère **Yahia** pour leurs soutiens de tous les instants de ma vie.

Aux parents de mon binôme : **Tente Amina** et **Tentant Mustapha**, ainsi que son frère **Abdallah** pour leurs encouragements, leurs patiences et leurs conseils.

A tous mes amis qui sont chers.

A mon binôme **Yousra**, une autre sœur pour moi que les jours nous a réuni, j'ai passée avec elle des beaux souvenirs, des moments précieux et une amitié inoubliable, je lui souhaite un parcours plein de bonheur et de réussite.

Soumia

Résumer

L'analyse de sept échantillons de sédiments marins provenant de différents districts d'Alger (Staouali, Aïn Taya), d'Aïn Témouchent, de Chleff (Ténès), de Béjaïa, de Jijel et d'Annaba a permis de recueillir de nombreux isolats du genre *Streptomyces* de deux chitinines additionnés de vitamines et d'agents sélectifs. La plupart des souches proviennent de l'emplacement de Staouali (Alger).

Les isolats obtenus ont été soumis à une étude taxonomique basée sur des critères macro et micro-morphologiques. Ils ont été liés à 5 groupes de *Streptomyces* dont la majorité est de type Spira (22 isolats) et Rectus Flexibilis (15 isolats). Les huit isolats restants appartenaient aux types Retinaculum Apertum (1 isolat), Spira and Retinaculum Apertum (6 isolats) et Spira .and Rectus Flexibilis (1 isolat).

Le profil de résistance aux antimicrobiens de 7 souches de *Staphylococcus aureus*, utilisé comme cible de tests de gonflement à l'agoniste, a été établi pour neuf antibiotiques appartenant à différentes classes. La majorité des souches présentent une sensibilité élevée à tous les antibiotiques anti-staphylococciques, à l'exception de la souche SaF qui a montré une résistance à plus de trois familles d'antibiotiques. Tous testés. Aureus have prouvé une résistance totale à la β -lactam family, y compris l'oxacilline.

L'activité antibactérienne a été révélée dans 31 des *Streptomyces* cultivés sur un milieu ISP2, avec des diamètres d'inhibition compris entre 15 et 40 mm. De plus, les souches nommées NS2, BS1, BS7, TS2, AS2 ont une activité antagoniste contre toutes les souches de *S. aureus*, y compris la souche SaF.

Mots clés: *Streptomyces*, sédiments marins, caractérisation morphologique, activité antagoniste, *Staphylococcus aureus* et profil de résistance.

الملخص

سمحت الدراسة التحليلية لـ 7 عينات من الرواسب البحرية والمأخوذة من ولاية الجزائر العاصمة (سطاوالي و. عين طاية) ، الشلف (تنس) ، بجاية، جيجل ، غنابة ، وعين تموشنت، من الحصول على خمسة وأربعين عزلة من *Streptomyces* في وسطين من الكيتين مضاف إليه الفيتامينات وبعض العناصر الانتقائية. معظم السلالات المتحصل عليها كانت من موقع سطاوالي .

كانت العزلات التي تم الحصول عليها موضوعاً لدراسة تصنيفية مبنية على المعايير الماكرو والميكرو مورفولوجية . أظهرت لنا النتائج أن 5 مجموعات من العزلات تنتمي إلى الجنس *Streptomyces* ومعظمها (22 عزلة) يصنف ضمن النمط *Spira* و (15) عزلة تنتمي إلى النمط *Rectus Flexibilis* حيث تنتمي العزلات الثمانية المتبقية إلى الأنماط التالية : عزلة واحدة *Retinaculum Apertum*، 6 عزلات من النمط *Spira* و *Retinaculum Apertum*، عزلة واحدة من النمط *Spira* و *Rectus Flexibilis* .

لقد تم الحصول على طيف المقاومة للمضادات الحيوية لسبعة سلالات من *Streptomyces* المكورات العنقودية والمستعملة كجراثيم مستهدفة خلال اختبارات النشاط المضاد للميكروبات، حيث استعمل 19 مضادا حيويا منتما إلى عدة فئات. غالبية هذه السلالات أظهرت حساسية عالية لجميع مضادات المكورات العنقودية. ماعدا السلالة SaF والتي أظهرت مقاومة لأكثر من ثلاث عائلات من المضادات الحيوية. أظهرت جميع بكتيريا المكورات العنقودية مقاومة كاملة لعائلة البيبتاكتامين، بما في ذلك الاكساسيلين.

تم الكشف عن نمط المقاومة في واحد وثلاثين سلالة من *Streptomyces* المستزرعة في الوسط ISP2 مع أقطار تثبيط بين 15 و 40 ملم. بالإضافة على ذلك، فإن السلالات المسماة ، AS2, NS2, BS1, BS7, TS2 لها نشاط مقاوم ضد جميع السلالات العنقودية الذهبية المختبرة بما في ذلك السلالة SaF.

الكلمات المفتاحية: *Streptomyce*، رواسب بحرية، معايير مورفولوجية، النشاط المضاد للميكروبات، بكتيريا عنقودية، نمط المقاومة.

Abstract

The analysis of seven samples of marine sediments from different districts of Algiers, (Staouali, Aïn Taya), Aïn Témouchent, Chleff (Ténès), Béjaïa, Jijel, and Annaba allowed us to collect forty-seven isolates of the genus *Streptomyces* from two chitin media supplemented with vitamins and selective agents. Most of the strains came from the location of Staouali, (Algiers).

The obtained isolates have been subjected to a taxonomic study based on macro and micro-morphological criteria. They have been linked to 5 groups of *Streptomyces* where the majority belongs to the *Spira* type (22 isolates) and *Rectus Flexibilis* (15 isolates). The remaining eight isolates belonged to *Retinaculum Apertum* (1 isolate), *Spira* and *Retinaculum Apertum* (6 isolates) and *Spira* and *Rectus Flexibilis* (1 isolate) types.

The antimicrobial resistance profile of 7 strains of *Staphylococcus aureus*, used as target germs during antagonism tests, was established against nineteen antibiotics belonging to different classes. The majority of these strains show a high sensitivity to all anti-staphylococcal antibiotics, with the exception of the strain SaF which has shown resistance to more than three families of antibiotics. All tested *S. aureus* have proved total resistance to the β -lactam family, including oxacillin.

The antibacterial activity was revealed in 31 of *Streptomyces* grown on ISP2 medium, with inhibition diameters between 15 and 40 mm. In addition, the strains named NS2, BS1, BS7, TS2, AS2 have an antagonistic activity against all the tested strains of *S. aureus* including the strain SaF.

Key words: *Streptomyces*, marine sediments, morphological characterization, antagonistic activity, *Staphylococcus aureus* and resistance profile.

Liste des figures

Figure 1. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de <i>Streptomyces</i> .	10
Figure 2. Technique de purification et de conservation.	19
Figure 3. Méthode des cylindres d'agar.	21
Figure 4. Nombre d'isolat de <i>Streptomyces</i> prélevés selon les sites d'étude.	22
Figure 5. Répartition des <i>Streptomyces</i> selon les milieux d'isolement.	23
Figure 6. Distribution des <i>Streptomyces</i> selon le type du MA.	24
Figure 7. Micromorphologie du MA de l'isolat LS17 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique.	25
Figure 8. Aspect du MA de l'isolat LS17.	27
Figure 9. Micromorphologie du MA de l'isolat AS3 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).	27
Figure 10. Aspect du MA de l'isolat AS3.	28
Figure 11. Micromorphologie du MA de l'isolat AS1 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).	29
Figure 12. Aspect du MA de l'isolat AS1.	29
Figure 13. Micromorphologie du MA de l'isolat JS1 sur le milieu ISP4 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).	30
Figure 14. Aspect du MA de l'isolat JS1.	31
Figure 15. Micromorphologie du MA de l'isolat BS1sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 effet de zoom).	31
Figure 16. Aspect du MA de l'isolat BS1.	32
Figure 17. Profil de résistance de la souche <i>S. aureus</i> (SaF).	38
Figure 18. Activité antagonistes de quelques souches de <i>Streptomyces</i> contre les <i>S. aureus</i> testés.	40
Figure 19. Fréquence des souches actives.	40
Figure 20. Activité antimicrobienne des isolats ayant une très bonne activité contre toutes les souches de <i>S. aureus</i> .	41

Liste des tableaux

Tableau 1. Principaux critères utilisés pour la chimiotaxonomie des actinobactéries	5
Tableau 2. Distribution de quelques souches de <i>Streptomyces</i> dans le milieu marin	10
Tableau 3. Quelques métabolites secondaires produits par les <i>Streptomyces</i> .	11
Tableau 4. Les maladies causées par <i>S.aureus</i> .	13
Tableau 5. Liste des antibiotiques utilisés pour la détermination du profil de résistance des souches de <i>S. aureus</i> .	16
Tableau 6. Les données sur les stations d'échantillonnages.	17
Tableau 7. Distribution des <i>Streptomyces</i> marines dans les prélèvements de sédiment analysés sur les milieux M1 et M2.	23
Tableau 8. Répartition des isolats de <i>Streptomyces</i> selon le type MA correspondant.	24
Tableau 9. Caractéristiques culturelles des <i>Streptomyces</i> du type S.	26
Tableau 10. Caractéristiques culturelles des <i>Streptomyces</i> du type RF.	28
Tableau 11. Caractéristiques culturelles de l'isolat AS1.	29
Tableau 12. Caractéristiques culturelles des <i>Streptomyces</i> du type SRA.	30
Tableau 13. Caractéristiques culturelles de l'isolat BS1.	32
Tableau 14. Profil de résistance des <i>S.aureus</i> aux antibiotiques.	37
Tableau 15. Résultats des tests d'antagonismes des souches de <i>Streptomyces</i>	39

Liste des abréviations

ARNr16 S :	Acide ribonucléique ribosomal de la sous unité 16S du ribosome
ATCC :	American type culture collection
BMR :	Bactéries multi-résistante
UFC :	Unité formant colonie
GC :	Guanine + cytosine
Gly :	Glycine
MA :	Mycélium aérien
MS :	Mycélium du substrat
PCR :	Réaction de polymérase en chaîne
PLP :	Protéine de liaison à la pénicilline
PS :	Pigments solubles
RF :	<i>Rectus Flexibilis</i>
SARM :	<i>Staphylococcus aureus</i> résistante à la méticilline
SC :	Straight chains (Chaînes droites)
Type S :	<i>Spira</i> (Spiralé)

Sommaire

Remerciements

Dédicaces

Liste des tableaux

Liste des figures

Liste des abréviations

Glossaire

Résumé

Abstract

ملخص

INTRODUCTION	1
Chapitre 1 : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	
I. Généralités sur les actinobactéries	3
1. Définition des actinobactéries et classification	3
II. Taxonomie des actinobactéries	3
1. Critères d'identification des genres	3
1.1. Critères morphologiques	3
a. Caractères macro-morphologique	4
b. Caractères micro-morphologiques	4
1.2. Critères chimiotaxonomique	4
2. Critères d'identification des espèces	7
2.1 Critères physiologique	7
2.2. Critères moléculaire	7
2.2.1. Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S	7
2.2.2. Hybridation ADN-ADN	7
2.2.3. Pourcentage en Guanine-Cytosine	8
III. Les actinobactéries marines	8
IV. Le genre <i>Streptomyces</i>	9
1. Définition du genre	9
2. Les <i>Streptomyces</i> dans le milieu marin	10
V. Importance des <i>Streptomyces</i>	11

IV. Les antibiotiques	12
1. Définition des antibiotiques	12
2. Mode d'action des antibiotiques	12
VI. <i>Staphylococcus aureus</i>	13
1. Les maladies causées par <i>S. aureus</i>	13
2. Antibiotiques antistaphylococciques	13
3. L'émergence de la résistance de <i>S. aureus</i>	14
Chapitre 2 : MATERIEL ET METHODES	
I. Matériel	15
1. Sites d'échantillonnages	15
2. Germes cibles	15
II. Méthodes	16
1. Méthodes de prélèvement	16
1. 1. Prélèvement	16
1. 2. Transport et conservation des échantillons	17
2. Isolement et purification	17
2.1. Traitement des échantillons	17
2.2. Préparation des milieux d'isollements	17
2.3. Préparation des vitamines	18
2.3. Préparation des dilutions et technique d'ensemencement	18
2.4. Incubation	18
2.5. Lecture et sélection	18
2.6. Purification et conservation des <i>Streptomyces</i>	18
3. Caractérisation morphologique des isolats	19
3.1. Caractérisation macroscopique	19
3.2. Caractérisation microscopique	20
4. Détermination du profil de résistances des souches de <i>S. aureus</i> .	20
4.1. Milieu pour antibiogramme	20
4.2. Préparation de l'inoculum	20
4.3. L'ensemencement	20
4.4. L'incubation	21
4.5. La lecture	21
5. Criblage de l'activité antibactérienne des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide	21

Chapitre 3 : RESULTATS ET DISCUSSION	
I. Isolement, distribution, et caractérisation morphologique des isolats	22
1. Isolement des <i>Streptomyces</i>	22
2. Sélection et distribution des isolats	22
3. Caractérisation morphologique des isolats de <i>Streptomyces</i>	24
3.1. Isolats de type S (groupe G1)	25
3.2. Isolat de typeRF (groupe G2)	27
3.3. Isolat de typeRA (groupe G3)	28
3.4. Isolats de typeSRA (groupe G4)	30
3.5. Isolat de typeSRF (groupe G5)	31
DISCUSSION	33
II. Etude de la résistance de <i>S. aureus</i> aux antibiotiques	36
III. Détermination du potentiel antagoniste des souches de <i>Streptomyces</i> isolées	38
DISCUSSION	42
CONCLUSION ET PERSPECTIVES	44
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	46
ANNEXES	56

I. Matériel

1. Sites d'échantillonnages

L'isolement des souches d'actinobactéries est réalisé à partir de 7 échantillons de sédiments marins. Ces derniers proviennent des régions d'Alger (Staouali, Aïn Taya), d'Aïn Témouchent, de Chleff (Ténès), de Béjaïa, de Jijel, et d'Annaba (tableau 6).

2. Germes cibles

Sept souches de *Staphylococcus aureus* ont été utilisées pour étudier leurs profils d'antibiorésistance vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques et évaluer l'activité antagonistes des isolats d'actinobactéries isolées. Six souches, codées de SaA à SaF, ont été isolées de l'environnement hospitalier du Centre Hospitalo Universitaire de Beni Messous (Alger). Une souche codée Sa639c appartenant à la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de l'Ecole Normale Supérieure (ENS) de Kouba ont également été sélectionnée pour notre travail.

Tableau 5. Liste des antibiotiques utilisés pour la détermination du profil de résistance des souches de *S. aureus* (Rahalet *al.*, 2014)

Famille d'antibiotique	Antibiotiques	Abréviation	Charge des disques
β-lactamines	Pénicilline G	PEN	10µg/ml
	Oxacilline	OXA	1 µg/ml
	Céfoxitine	FOX	30µg/ml
Aminosides	Amikacine	AN	30 µg/ml
	Gentamicine	GEN	10µg/ml
	Kanamycine	KAN	30µg/ml
Macrolides	Erythromycine	ERY	15µg/ml
	Pristinamycine	PR	15µg/ml
Quinolones	Ofloxacin	OFX	5µg/m
	Lévofoxacin	LVX	5µg/m
	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml
Phénicoles	Chloramphénicol	CHL	30µg/ml
Glycopéptides	Vancomycine	VAN	30 µg/ml
	Teicoplanine	TEC	30 µg/ml
Rifamycines	Rifampicine	RIF	5µg/ml
Sulfamides	Triméthoprime+Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75µg/ml
	Tétracycline	TCY	30µg/ml
Fusidanines	Acide Fusidique	FUS	10µg/ml
Acide phosphonique	Fosfomycine	FOS	4 µg/ml

II. Méthodes

1. Méthodes de prélèvement

1. 1. Prélèvement

Sur chaque site nous avons prélevé 3 échantillons de sédiment marin d'une profondeur de 2 m (tableau 6). Nous avons rassemblé et homogénéisé chaque récipient de sédiment afin d'obtenir un échantillon composite. Nous avons mis les sédiments dans des flacons stériles en verre préalablement lavés et soigneusement rincés pour éliminer toute trace d'un éventuel détergeant, séchés et stérilisés à l'autoclave à 120 °C pendant 20 minutes. Nous avons étiqueté les récipients sur lesquelles nous avons mentionné la date et le code de l'échantillon (Salmon *et al.*, 2014).

Tableau 6. Les données sur les stations d'échantillonnages.

Région	Code	Position géographique	Profondeur	Distance
Annaba	AS	36°54'15 "N7°45 '07"E	1m	2m
Béjaïa	BS	36°45'00"N5°04'00"E	1m	2m
Aïn Témouchent	HS	35°18'08."N1°23'01."W	1m	2m
Jijel	JS	36°49'00"N5°46'00"E	1m	2m
Staouali	LS	36°45'21"N2°53'25"E	1m	2m
Ténès	NS	36°30'44"N1°18'16"E	1m	2m
Aïn Taya	TS	36°47'00"N3°14'00"E	1m	2m

1. 2. Transport et conservation des échantillons

Les échantillons sont transportés au laboratoire, le jour même, dans une glacière à $5 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (Isabelle et Didier, 2015).

2. Isolement et purification

2.1. Traitement des échantillons

Nous avons traité les échantillons de sédiments par un séchage à l'air libre pendant 24 heures puis les échantillons de sédiments sont laissés à température ambiante du laboratoire (Nonomura et Ohara, 1969).

2.2. Préparation des milieux d'isolements

L'isolement des isolats de *Streptomyces* est effectué tel qu'il a préconisé Hayakawa et Nonomura (1987), sur le milieu Chitine-Vitamines agar (Ch-V) préparé à base de l'eau distillé (nommé le milieu M1) et le milieu préparé avec l'eau de mer additionné de chitine et des vitamines B (nommé milieu M2). Des agents sélectifs ont été additionnés à ces

milieux : l'actidione à 50 mg L^{-1} afin d'éviter les infestations par les champignons présents dans les sédiments et l'acide nalidixique à 10 mg L^{-1} qui permet d'inhiber les bactéries à Gram négatif et d'orienter la sélection vers des isolats de *Streptomyces* pouvant être intéressantes (Sabaouet *al.*, 1998). (voir compostion en annexe 1). Les vitamines sont ajoutées aux milieux d'isolement pour permettre la croissance des actinobactéries auxotrophes.

2.3. Préparation des dilutions et technique d'ensemencement

La suspension mère est préparée par addition de 5g de sédiment préalablement séché dans 45 ml d'eau distillée stérile (dilution notée 10^{-1}). Deux dilutions (10^{-2} et 10^{-3}) sont préparées après homogénéisation de la dilution de départ par agitation vigoureuse pendant 5 minutes à l'aide d'un vortex. Un volume de 0,1 ml de chaque dilution est étalé sur les milieux M1 et M2 précédemment stérilisé et coulé dans des boîtes de pétri stériles de 9 cm de diamètre à raison de trois répétitions pour chaque dilution (Rapilly, 1968).

2.4. Incubation

Les boîtes ensemencées sont incubées dans une étuve à 30°C pendant 2 à 4 semaines et examinées régulièrement, en raison de la croissance parfois assez lente des actinobactéries (Rapilly, 1968).

2.5. Lecture et sélection

Les colonies qui ont montré, après observation à l'œil nu et au microscope optique (grossissement $\times 10$ et $\times 40$), les caractéristiques morphologiques des *Streptomyces*, en particulier la formation d'un mycélium aérien (MA) avec des sporophores formant des chaînes de spores qui peuvent être droites à flexueuses (type RF = *Rectus Flexibilis*), en crochets ou en boucles fermées (type RA = *Retinaculum Apertum*) ou encore spiralées (type S = *Spira*) et d'un mycélium du substrat (MS) non fragmenté avec des filaments ramifiés très fins ont été repérés. Ces derniers ont été considérés d'une manière présomptive comme des isolats de *Streptomyces* (Shirling et Gottlieb, 1966).

2.6. Purification et conservation des *Streptomyces*

Les colonies sélectionnées sont prélevées délicatement à l'aide d'une pointe stérile puis purifiées par stries sur milieu ISP2. Les isolats, purifiés numérotés et codés, sont ensemencés sur le même milieu coulé en pente dans des tubes à vis. Ces derniers sont incubés dans une étuve à 30°C pendant 2 à 4 semaines, puis conservés à 4°C dans un réfrigérateur (figure 2). Le milieu ISP2, à base de glucose, d'extrait de malt et d'extrait de levure, est choisi car il

constitue le milieu de référence pour la culture des *Streptomyces* et permet une bonne croissance des isolats (Shirling et Gottlieb, 1966).

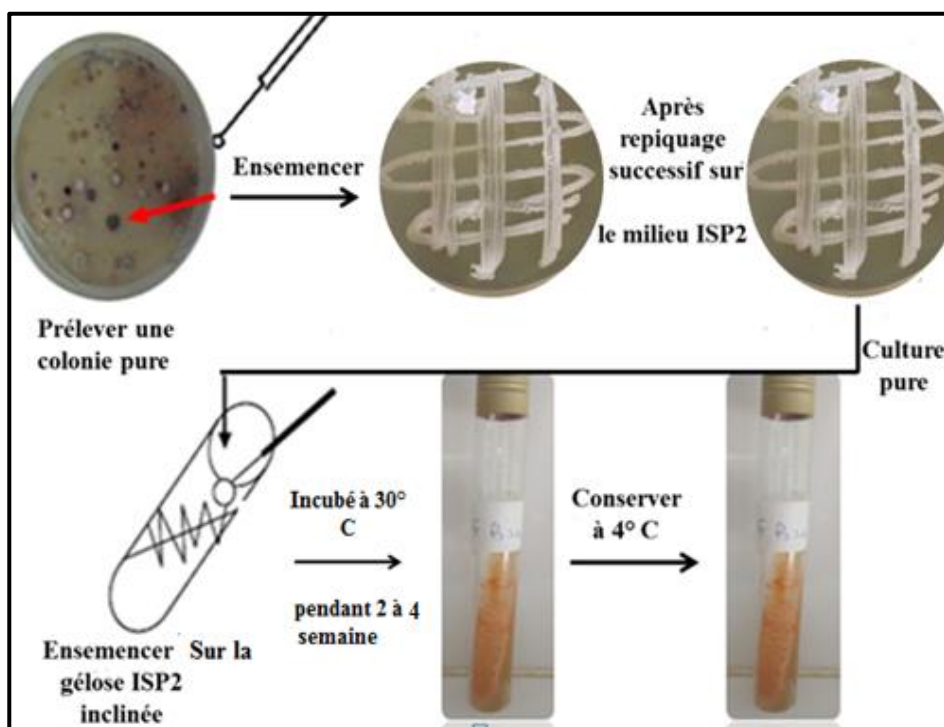


Figure2. Technique de purification et de conservation.

3. Caractérisation morphologique des isolats

L'étude morphologique des isolats de *Streptomyces* est effectuée sur les milieux ISP2 et ISP4 préconisés par « l'International *Streptomyces* Project » (Athalye *et al.*, 1985) (annexe 1). La lecture des résultats a été effectuée sous la supervision du Pr. Sabaou (directeur du LBSM).

3.1. Caractérisation macroscopique

L'étude macromorphologique consiste à déterminer la couleur du MA et du MS, la croissance (faible, moyenne, bonne) ainsi que les pigments solubles produits (PS) sur les deux milieux de culture utilisés. La couleur du MA, du MS, et des PS est déterminée en se référant à une charte de couleur (Color Name Chart Illustrated with Centroid Color: ISCC-NBS) (Shirling et Gottlieb, 1966).

3.2.Caractérisation microscopique

Les isolats obtenus sur les différents milieux cités précédemment sont observés à l'aide d'un microscope optique (Optika) à deux grossissements (x10 et x40) après deux semaines d'incubation. Ces observations sont réalisées directement sur les boîtes de Pétri et ce pour étudier les mycélium en place sans en altérer les structures. Elles consistent à voir également la sporulation caractéristique des souches sélectionnées ainsi que la fragmentation ou non du mycélium du substrat (Williams *et al.*, 1983).

4. Détermination du profil de résistances des souches de *S. aureus*.

4.1. Milieu pour antibiogramme

Le milieu adéquat pour effectuer l'antibiogramme est le milieu Mueller -Hinton coulé en boîtes de Pétri sur une épaisseur de 4 mm (voir composition en annexe 1). Les géloses doivent être séchées avant l'emploi(Rahalet *al.*, 2014).

4.2. Préparation de l'inoculum

Les souches de *S. aureus* ont été repiquées sur le milieu Mueller-Hinton (MH) et incubées à 37°C pendant 24 h. Des suspensions ont été préparées pour chaque souche par transfert de quelques colonies bien isolées et parfaitement identique dans 15 ml d'eau physiologie stérile à 0,9%. Les suspensions de germes cibles sont calibrées par la méthode photométrique. L'absorbance est lue à la longueur d'onde de 625 nm et doit être comprise entre 0,08 et 0,13 ce qui correspond à un étalon de 0,5 Mc Farland, soit approximativement $1-2 \times 10^8$ UFC/ ml (EUCAST, 2013).

4.3. L'ensemencement

L'ensemencement se fait en profondeur dans des flacons contenant 25ml du milieu Mueller -Hinton, en prélevant un volume 100 µl de chaque suspension bactérienne après agitation vigoureuse pendant 5 minutes à l'aide d'un vortex. Le milieu ensemencé par la bactérie correspondante sera coulé dans des boîtes de Pétri de 90 mm de diamètre. Nous avons mis 5 disques d'antibiotiques par boîtes afin d'éviter la confrontation des différentes zones d'inhibition générées par les disques d'antibiotiques. Nous avons veillé à ne pas déplacer le disques après application. Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2h, pour permettre la diffusion des antibiotiques et empêcher momentanément la croissance des microorganismes cibles (Rahalet *al.*, 2014).

4.4. L'incubation

L'incubation a eu lieu à 37°C pendant 18h à prolonger de 24h pour oxacilline, vancomycine, teicoplanine à température ambiante (Rahalet *al.*, 2014).

4.5. La lecture

La lecture des résultats est réalisée par la mesure des zones d'inhibition à l'aide d'un pied de coulisse. Les résultats obtenus seront comparés aux valeurs critiques figurant dans la table de lecture correspondantes (annexe 2). Les bactéries ont été classées dans l'une des catégories résistant (R), sensible (S) ou intermédiaire (I) (Rahalet *al.*, 2014).

5. Criblage de l'activité antibactérienne des *Streptomyces* sur milieu solide

Il s'agit d'un criblage (screening) dont l'objectif est de déterminer l'activité antagoniste de tous les isolats de *Streptomyces*. La méthode utilisée est celle des cylindres d'agar sur milieu MH contre les 8 souches de *S. aureus*. Les *Streptomyces* sont ensemencés en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2 solide (20 g L⁻¹ d'agar). Les boîtes ont été incubées à 30°C pendant 10 jours. Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre contenant les cultures des *Streptomyces* sont ensuite découpés à l'aide d'un emporte-pièce en acier inoxydable stérilisé par flambage au bec Bunsen et déposés à la surface du milieu MH préalablement ensemencé par les germes-cibles. Les boîtes sont placées à 4°C pendant 2h, puis incubées à 37°C pendant 24 h. L'évaluation de l'activité antagoniste est réalisée par la mesure des zones d'inhibition (zone claire) autour des cylindres des cultures de *Streptomyces* (figure 3) (Hwang *et al.*, 2001; Woo *et al.*, 2002).

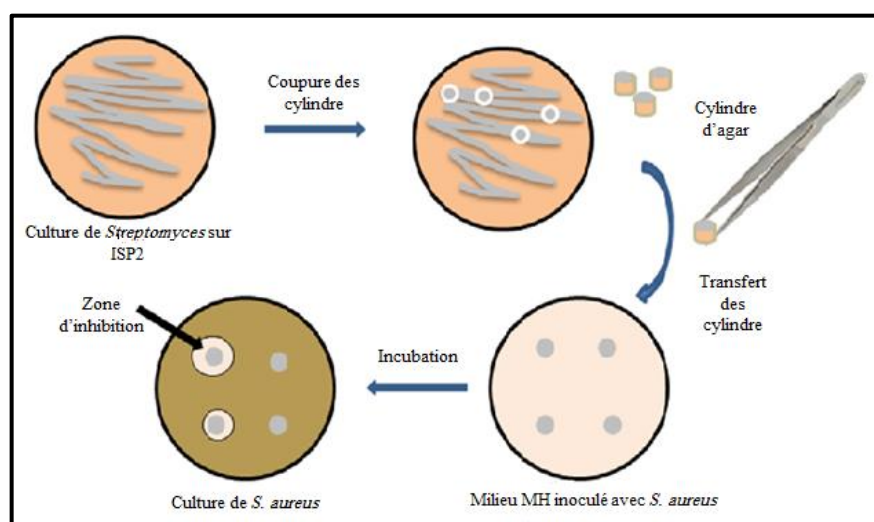


Figure 3. Méthode des cylindres d'agar (Nalubega, 2016).

II. Etude de la résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

L'ensemble des souches de *S. aureus*, utilisées comme germes cibles dans la présente étude ont été testées vis-à-vis de 19 molécules d'antibiotiques appartenant à divers familles, recommandées par standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle national (médecine humaine et vétérinaire) (Rahalet *al.*, 2014). Le profil de résistance des souches de *S. aureus* est variable selon l'antibiotique testé et selon les souches de *S.aureus*.

Les résultats obtenus ont montré que toutes les souches de *S.aureus* testées sont résistantes aux β -lactamines (l'Oxacilline, la pénicilline et la céfoxitine). Cette résistance est aussi importante contre la rifamycine (5 souches résistantes) et l'erythromycine (4 souches résistantes). Une résistance moyenne à faible est remarquée contre les autres familles d'antibiotiques testées. Cependant toutes les souches sont sensibles à la fosfomycine, l'amikacine, la kanamycine, l'ofloxacin et lévofloxacin (Tableau 14).

Toutes les souches de *S. aureus* testées présentent une faible résistance vis-à-vis de l'ensemble des antibiotiques antistaphylococciques mis à part la souche SaF qui présente une résistance à 13 antibiotiques testés. Cela montre que la souche SaFest la plus résistante parmi toutes les souches de *S. aureus* testés. En effet, les autres souches présentent une sensibilité à plus de 12 antibiotiques antistaphylococciques. (tableau 14, figure 17).

Tableau 14. Profil de résistance de *S. aureus* aux antibiotiques

Souches de <i>S. aureus</i>	Antibiotiques utilisés																			Nombre d'antibiotiques		
	β -lactamines			Aminosides			Macrolide		Quinolones			Phénicol	Glycopéptide		Rifamycine	Sulfamides		Fusidanine	Acide phosphonique	Catégories cliniques		
	PEN	OXA	FOX	AN	KAN	GEN	ERY	PR	OFX	LVX	CIP	CHL	VAN	TEC	RIF	SXT	TCY	FUS	FOS	R	I	S
Sa639c	R			S			S		S	S	R	S	S		S	S		S	S	4	-	15
Sa A	R			S			S		S			S	S		R	S		S	S	5	-	14
Sa B	R			S			R	S	S			S	S		R	I	S	S	S	5	1	13
Sa C	R			S			R	S	S			S	S		R	I	S	R	S	6	1	12
Sa D	R			S			I	S	S			S	S		S	S		S	S	3	1	15
Sa E	R			S			R	S	S			S	S		R	I	S	R	S	6	1	12
Sa F	R			S		R	R		S		I	R	R		R	R		R	S	13	1	5

PEN: Pénicilline-G, **OXA:** Oxacilline, **FOX:** Céfoxitine, **AN :** Amikacine, **GEN:** Gentamicine , **KAN:** Kanamycine, **ERY :** Erythromycine, **PR:** Pristinamycine, **OFX :** Ofloxacin **CIP:** Ciprofloxacine, **LVX :** Lévofloxacine, **CHL:** Chloramphénicol, **VAN :** Vancomycin, **TEC:** Teicoplanine, **RIF:** Rifampicine, **SXT :** Triméthoprim+Sulfaméthoxazole, **TCY :** Tétracycline, **FUS :** Acide Fusidique, **FOS :** Fosfomycine. ; **R :** résistant, **S :** sensible, **I :** intermédiaires.

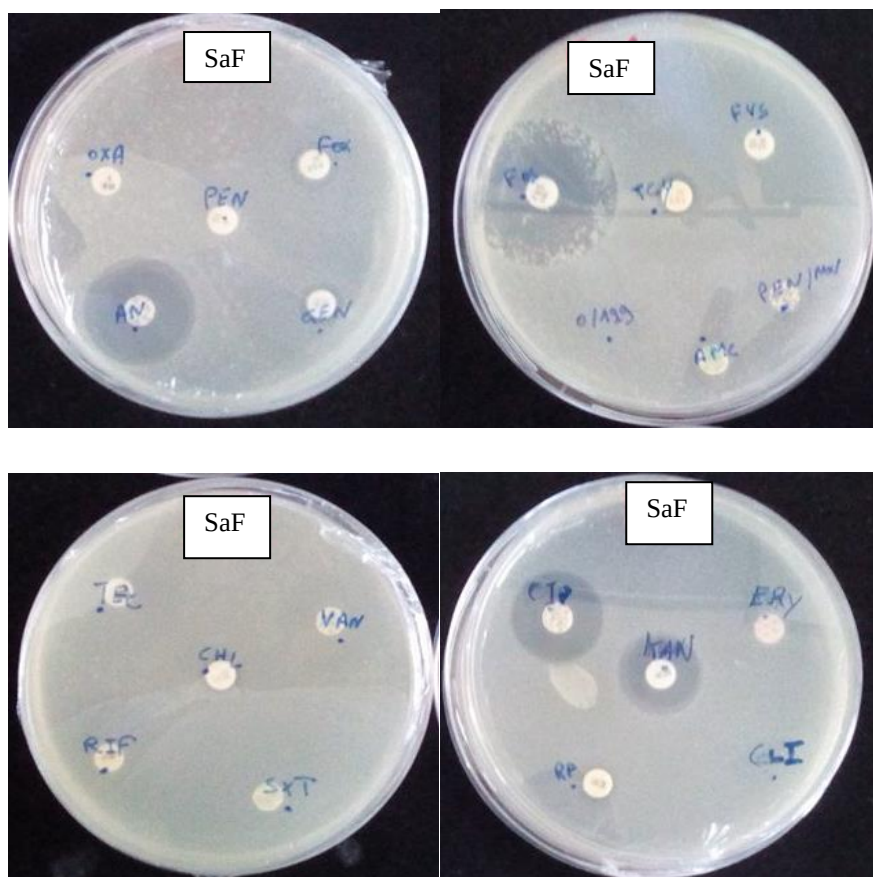


Figure 17. Profil de résistance de la souche *S. aureus* (SaF).

PEN: Pénicilline-G, **OXA:** Oxacilline, **FOX:** Céfoxitine, **AN :** Amikacine, **GEN:** Gentamicine, **KAN:** Kanamycine, **ERY :** Erythromycine, **PR:** Pristinamycine, **OFX :** Ofloxacin **CIP:** Ciprofloxacine, **LVX :** Lévofloxacine, **CHL:** Chloramphénicol, **VAN :** Vancomycin, **TEC:** Teicoplanine, **RIF:** Rifampicine, **SXT :** Triméthoprim+Sulfaméthoxazole, **TCY :** Tétracycline, **FUS :** Acide Fusidique, **FOS :** Fosfomycine.

III. Détermination du potentiel antagoniste des souches de *Streptomyces*

Le pouvoir antagoniste des 45 souches de *Streptomyces* sélectionnés a été testé par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu ISP2 contre 7 souches de *S. aureus* pour évaluer le potentiel de production des antimicrobiens par les *Streptomyces*. Les résultats de ce test sont consignés dans le (tableau 15, figure 18).

Tableau 15. Résultats des tests d'antagonismes des souches de *Streptomyces*.

Souches de <i>Streptomyces</i>	Zone d'inhibition (mm)						
	Sa639	Sa1	Sa2	Sa3	Sa4	Sa5	Sa6
LS4	-	-	16R	18R	-	17	-
LS5	17	-	-	-	-	-	-
LS6	15	-	-	-	-	-	-
LS7	30	15	16	17	15R	15	15
LS8	33	-	23	22	19	22	24
LS9	30	23	15	15	30	17	-
LS12	22	-	-	-	-	-	-
LS13	-	-	-	-	14	-	-
LS14	26	-	-	-	-	-	-
LS15	25	16	-	-	24	-	-
LS16	35	25	15	15	30	14R	15
LS18	18	-	-	-	-	-	13
LS19	17	-	-	-	-	-	-
LS22	20	-	-	-	-	-	-
BS1*	30	20	23	21	22	21	25
BS2	18	14	19R	20R	21	15R	-
BS6	22	-	-	-	-	-	-
BS7*	21	19	25	25	30	24	29
NS1	25	-	-	-	17	-	-
NS2*	40	14	16	17	15R	15	15
NS3	15	-	12	-	-	-	14 R
NS4	25	-	17	18	15	18	23
NS5	15	-	-	-	-	-	-
NS6	16	-	-	-	-	-	-
AS2*	32	22	22	23	22	22	24
AS3	30	20	-	-	18	-	-
TS1	15R	-	-	-	-	-	-
TS2*	34	22	15	18	25	16	17
HS1	15	-	-	-	-	-	-
HS2	30	29	16	19	29	17	-
JS1	30	21	31	31	-	35	25
LS1, LS2, LS3, LS10, LS11, LS17, LS20, LS21, BS3, BS4, BS5, BS8, NS7, et AS1	-	-	-	-	-	-	-

R :ralentissement, - : Absence d'activité.

* : souches ayant une activité contre toutes les *S. aureus* testés.

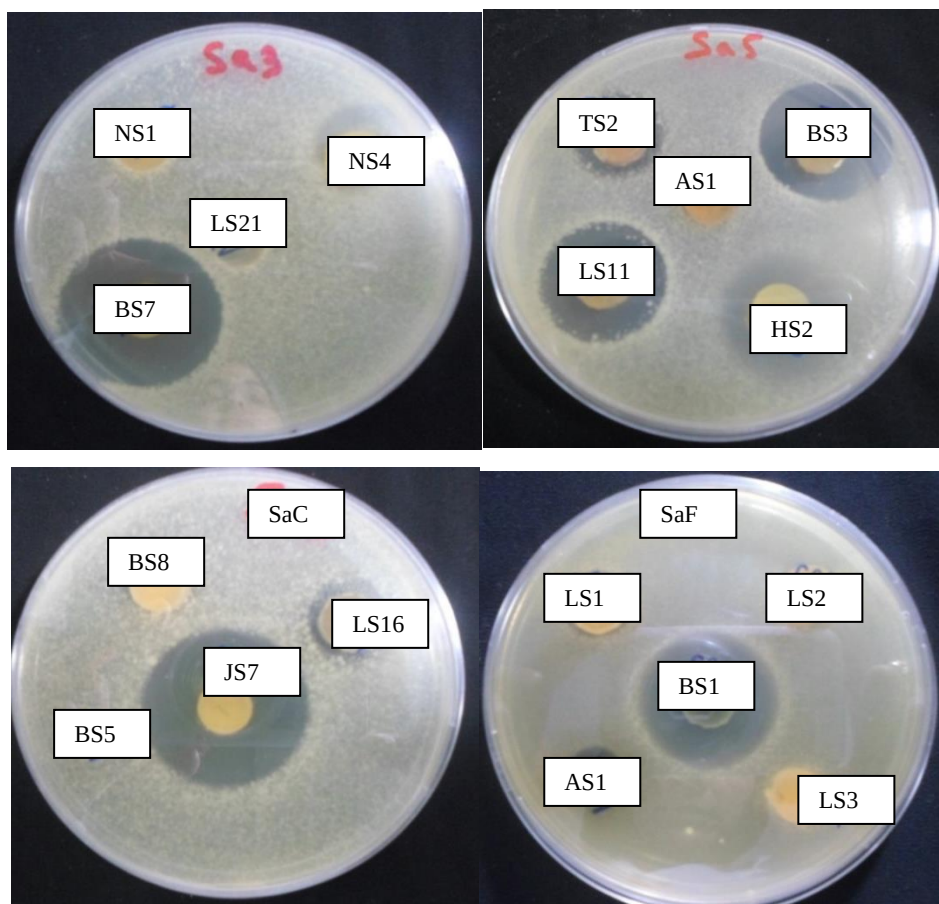


Figure 18. Activité antagonistes de quelques souches de *Streptomyces* contre les *S. aureus* testés.

Sur les 45 souches de *Streptomyces* testés, 31 souches (soit 68,88 %) ont montrées une activité antagoniste contre au moins une souche de *S. aureus* avec une zone d'inhibition supérieure à 12 mm. En revanche 14 souches (soit 31,11%) n'ont montré aucunes activités (figure 19). Parmi les souches actives 5 souches (NS2, BS1, BS7, TS2, et AS2) ont montré des activités moyennes à bonne contre toutes les souches de *S. aureus* testées avec des diamètres d'inhibition de 15 à 40 mm (figure 20).

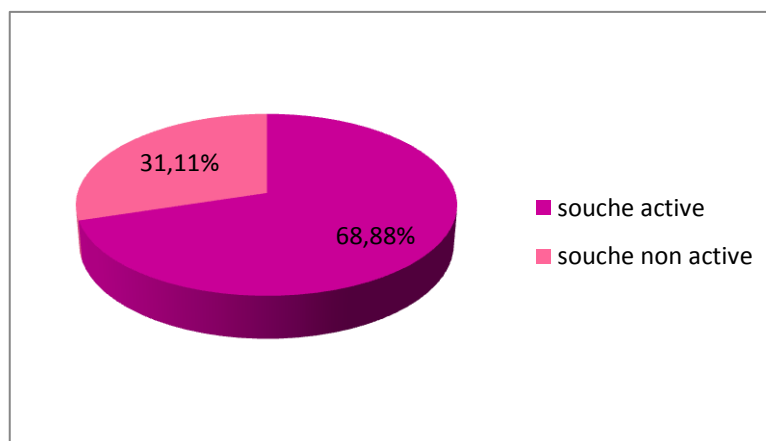


Figure 19. Fréquence des souches actives.

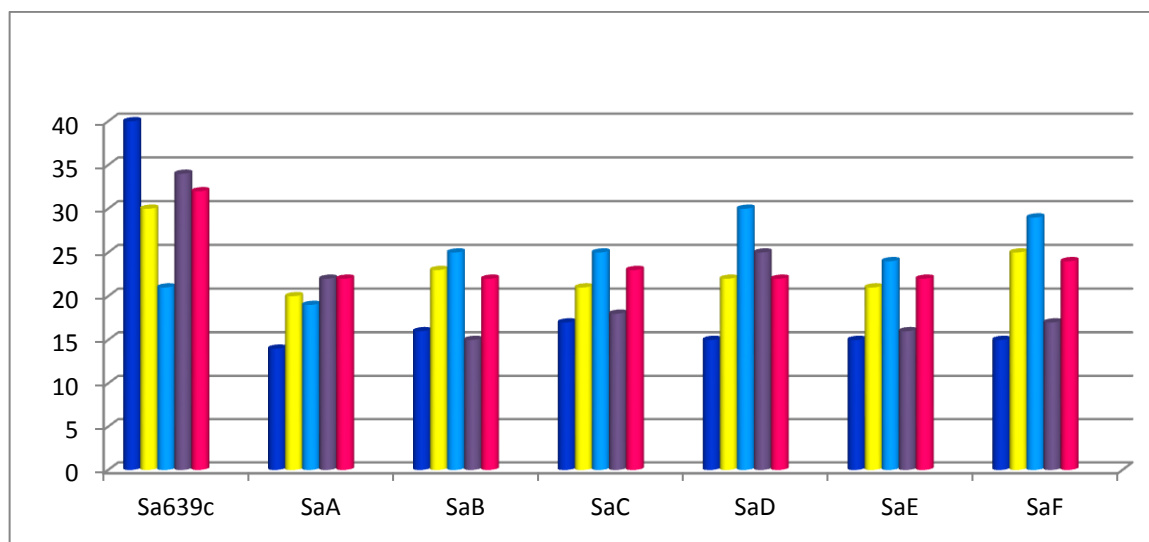


Figure 20. Activité antimicrobienne des isolats ayant une très bonne activité contre toutes les souches de *S. aureus*.

Nous soulignons que la majorité des *Streptomyces* (31 souches) sont actives contre la souche Sa639c et uniquement 14 à 18 souches de *Streptomyces* sont actives sur les autres *S. aureus* testés.

Discussion

Toutes les souches de *S. aureus* étudiées sont résistantes aux β -lactamines dont l'oxacilline ce qui les qualifie de *S. aureus* résistant à la m $\acute{e}$ ticilline (SARM) (Daurel et Leclercq, 2008). En effet, les *S. aureus* qui sont résistants aux p $\acute{e}$ nicillines du groupe M, sont connus pour leur habilit $\acute{e}$ à résister à plusieurs autres groupes d'antibiotiques et tout particuli $\acute{e}$ rement aux rifamycines et aux macrolides (Leclercq, 2002 ; Nikaido, 2009) ce qui corrobore avec nos r $\acute{e}$ sultats. La r $\acute{e}$ sistance à l'oxacilline corréle avec la pr $\acute{e}$ sence du g $\acute{e}$ ne *mecA*. Ce g $\acute{e}$ ne est port $\acute{e}$ par un $\acute{e}$ l $\acute{e}$ ment g $\acute{e}$ n $\acute{e}$ tiquement mobile et code pour la prot $\acute{e}$ ine PLP2a additionnelle impliqu $\acute{e}$ e dans la biosynth $\acute{e}$ se du peptidoglycane. Selon la litt $\acute{e}$ rature, la r $\acute{e}$ sistance des *S. aureus* à la famille des β -lactamines est plus remarquable contre la p $\acute{e}$ nicilline avec 80 à 95 %; cela est expliqu $\acute{e}$ par la production d'une p $\acute{e}$ nicillinase (Daurel et Leclercq, 2008). Par ailleurs, notre $\acute{e}$ tude a r $\acute{e}$ v $\acute{e}$ l $\acute{e}$ que le taux de sensibilit $\acute{e}$ $\acute{e}$ t $\acute{e}$ tr $\acute{e}$ s $\acute{e}$ lev $\acute{e}$ vis-à-vis les autres familles d'antibiotique utilis $\acute{e}$ s. Cela corrobore avec les r $\acute{e}$ sultats rapport $\acute{e}$ s par le r $\acute{e}$ seau alg $\acute{e}$ rien de surveillance de la r $\acute{e}$ sistance bact $\acute{e}$ rienne aux antibiotiques dans son 13 $^{\text{e}}$ me rapport, avec 58% de souches de *S. aureus* sensibles en Alg $\acute{e}$ rie (Draghiet *al.*, 2004).

Parmi les souches de *S. aureus* testées, la souche SaF se distingue par sa résistance à la majorité des antibiotiques (13 antibiotiques) utilisés ce qui la qualifie d'une Bactérie Multi-Résistante (BMR) (Khiev et Veber, 2010).

Actuellement, un intérêt particulier est accordé à la surveillance et au dépistage des BMR dont font partie les *S. aureus* multirésistants. Ces bactéries sont considérées comme un réservoir de gènes de résistances (Birgand et Lucet, 2013).

La mise en évidence de l'activité antagoniste des 45 souches de *Streptomyces* contre les Staphylocoques a été mesurée par la méthode des cylindres d'agar sur le milieu ISP2. Ce dernier a été choisi sur la base des résultats obtenus par les chercheurs de laboratoire LBSM (Badji *et al.*, 2007 ; Boudjella, 2007 ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Bouznada, 2018). Les résultats obtenus ont montrés que 31 souches (soit 68,88 %) ont une activité antagoniste contre au moins une souche de *S. aureus* testée, avec un degré d'activités variant selon les souches. Ces résultats sont similaires à ceux rapportés par Driche, 2016 qui a travaillé sur les *Streptomyces* antagonistes aux staphylocoques. Il a trouvé que 68% des souches d'actinobactéries actives sont des *Streptomyces*. Cette grande capacité antagoniste vis-à-vis des *S. aureus* a été également soulignée par plusieurs auteurs (Sabaoui *et al.*, 1998 ; Solecka *et al.*, 2012 ; Aouiche *et al.*, 2012 ; Toumatia *et al.*, 2014 ; Diche, 2016). Comparé aux travaux réalisés sur les *Streptomyces* isolés des sédiments marins, nos souches de *Streptomyces* ont montré une bonne activité anti-staphylococcique qui concorde avec les résultats obtenus par (Solanki *et al.*, 2008). Dans le travail d'Anza *et al.* (2008) le nombre global des souches qui ont une activité antagoniste est de l'ordre de 30% contre les *S. aureus*.

Cinq souches de *Streptomyces* (NS2, BS1, BS7, TS2, et AS2) ont montré une bonne activité contre toutes les *S. aureus* testées. Les plus grandes activités antagonistes ont été obtenues contre *S. aureus* 639c avec une sensibilité aux antimicrobiens sécrétés par 31 souches de *Streptomyces* testées. Nous notons que 14 souches de *Streptomyces* sont actives contre la souche SaF de *S. aureus* qui présente une résistance à la majorité des antibiotiques commercialisés ce qui nous a permis de déduire que ces souches de *Streptomyces* peuvent être une source importante de nouvelles molécules bioactives, et peuvent remplacer la gamme des antibiotiques qui y sont résistantes. L'utilisation des germes cibles ayant un profil de résistance bien établi est recommandée dans le criblage des activités antimicrobiennes. Les stratégies de recherche de nouvelles molécules sont multiples et sont orientées principalement vers la recherche des molécules actives produites par des microorganismes provenant d'habitats non exploités auparavant (Newman et Cragg, 2007). Plusieurs espèces de

Streptomyces d'origine marines ont été récemment décrites et étudiées pour leur potentiel à produire des métabolites secondaire, y compris la production des antibiotiques. Ces antibiotiques sont originaux et particuliers par rapport à ceux produits par les actinobactéries terrestres (Sanchez *etal.* 2003; Maskey*etal.*, 2004; Macherla*etal.* 2005).

I. Isolement, distribution et caractérisation morphologique des isolats

1. Isolement des *Streptomyces*

L'isolement des *Streptomyces* marins est effectué sur le milieu chitine-vitamines agar à base de l'eau distillé (milieu M1) et un deuxième milieu à base d'eau de mer, de chitine et de vitamines B (milieu M2) additionnés des agents sélectifs et incubé à 30°C pendant 2 à 4 semaines. Les colonies qui ont montré, après observation au microscope optique, les caractéristiques morphologiques des *Streptomyces*, en particulier la formation du MA aux sporophores formant des chaînes de spores et du MS non fragmenté avec des filaments très fins ont été repérées. Les *Streptomyces* ont été retrouvés dans les 7 échantillons analysés.

2. Sélection et distribution des isolats

Un total de 45 isolats de *Streptomyces* a été sélectionnés pour la présente étude, à partir de différentes côtes: Ténès (7 isolats), Jijel (1 isolat), Béjaïa (8 isolats), Staouali (22 isolats), Annaba (3 isolats), Aïn Témouchent (3 isolats) et Aïn Taya (2 isolats) (figure 4).

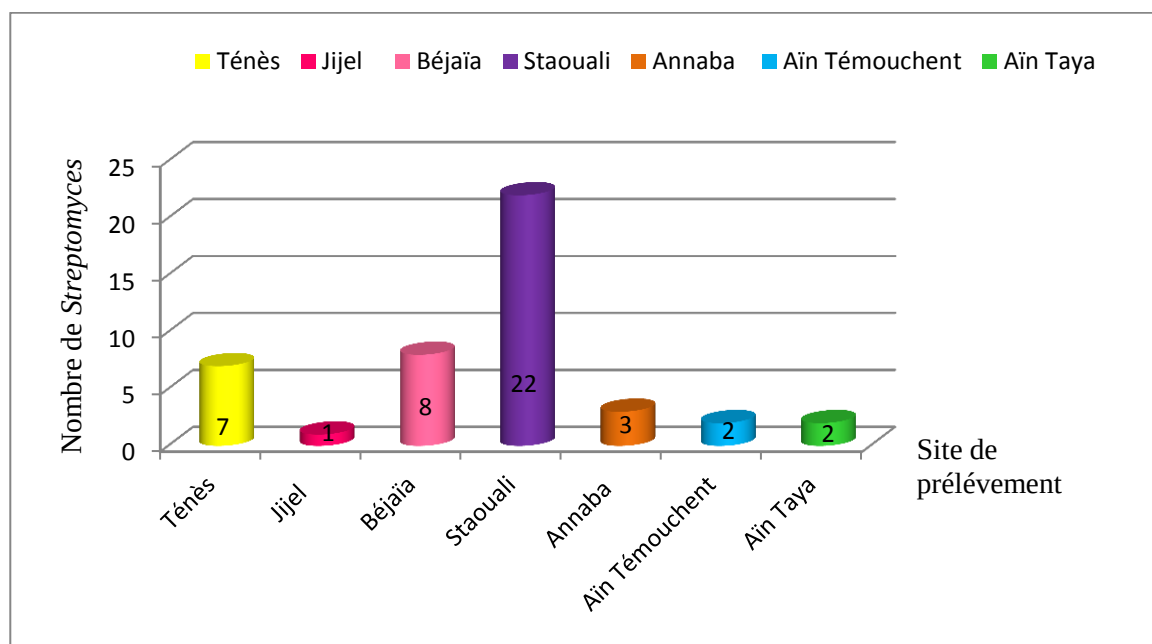


Figure 4. Nombre d'isolats de *Streptomyces* prélevés selon les sites d'étude

Les deux milieux utilisés nous ont permis d'isoler les *Streptomyces* mais le milieu M1 s'est révélé être le meilleur. En effet, 32 isolats (71,11%) ont été prélevés du milieu M1, 13 isolats (28,9%) du milieu M2 (figure 5 et tableau 7). Cette sélection est basée essentiellement sur la

diversité culturelle et morphologique remarquée lors de l'observation à l'œil nu et au microscope optique sur les milieux d'isolement.

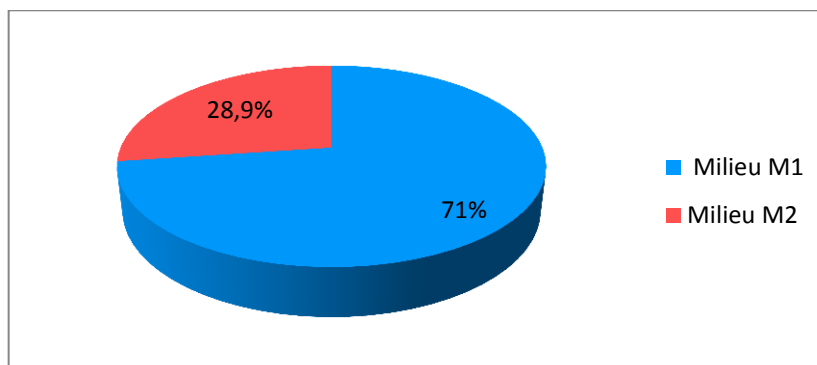


Figure5. Répartition des *Streptomyces* selon les milieux d'isolement.

Tableau7. Distribution des *Streptomyces* marines dans les prélèvements de sédiment analysés sur les milieux M1 et M2.

Dilution Sédiment	M1			M2		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
NS	-	NS2	NS1	NS3 NS4 NS5 NS6	NS7	-
BS	BS2 BS4 BS6 BS7 BS8	BS1	-	BS3 BS5	-	-
LS	LS1 LS9 LS10 LS11 LS12 LS13 LS14 LS15 LS20 LS21	LS2 LS3 LS4 LS5 LS6 LS7 LS8	-	-	LS16 LS17 LS18 LS19 LS22	-
AS	AS1	-	AS2 AS3	-	-	-
TS	TS2 TS3	-	-	-	-	-
HS	HS1	-	-	HS2	-	-
JS	-	JS1	-	-	-	-

NS= sédiment de Ténès. BS= sédiment de Béjaïa. LS=sédiment de Staouali. AS= sédiment d'Annaba.

TS= sédiment d'Aïn Taya. HS= sédiment d'Aïn Témouchent. JS= sédiment de Jijel. - = aucun isolat n'a été prélevé

3. Caractérisation morphologique des isolats de *Streptomyces*

L'étude morphologique des 45 isolats de *Streptomyces* marins est effectuée sur les milieux ISP2 et ISP4. La plupart des isolats sectionnés (45 isolats) sont caractérisés par un MS qui ne se fragmente pas et un MA qui produit des chaînes de spores plus ou moins longues (5 à 50 spores par chaîne en général) portées par des sporophores bien développés aboutissant à la formation de chaînes de spores de types variables selon les isolats. Ces chaînes peuvent être spiralées (**type S** = *Spira*), en boucle fermées et/ou en crochets (**type RA** = *Retinaculum Apertum*) ou encore droites à flexueuses (**type RF** = *Rectus Flexibilis*). Certains isolats possèdent à la fois les types S et RA (**SRA**) ou S et RF (**SRF**). Cette diversité dans l'organisation des chaînes de spores du MA nous a permis de classer nos isolats dans 5 groupes (tableau 8 et figure 6). Une diversité dans les caractéristiques macromorphologiques étudiées a été remarquée au sein de ces groupes ce qui nous a permis de diviser chaque groupe en sous-groupes.

Tableau 8. Répartition des isolats de *Streptomyces* selon le type du MA correspondant.

Groupe	Isolats de <i>Streptomyces</i>	Type de mycélium
G1	LS1, LS2, LS6, LS8, LS9, LS10, LS11, LS14, LS15, LS16, LS17, LS19, LS21, LS22, NS1, NS3, NS4, BS6, BS8, HS2, TS2, et AS2	Type S
G2	NS2, NS5, NS6, LS4, LS5, LS12, LS13, LS18, BS2, BS3, BS4, BS5, AS3, HS1 et TS1	Type RF
G3	AS1	Type RA
G4	NS7, LS3, LS9, LS20, BS7, et JS1	Type SRA
G5	BS1	Type SRF

*=Des micrographies sont présentées ci-dessous.

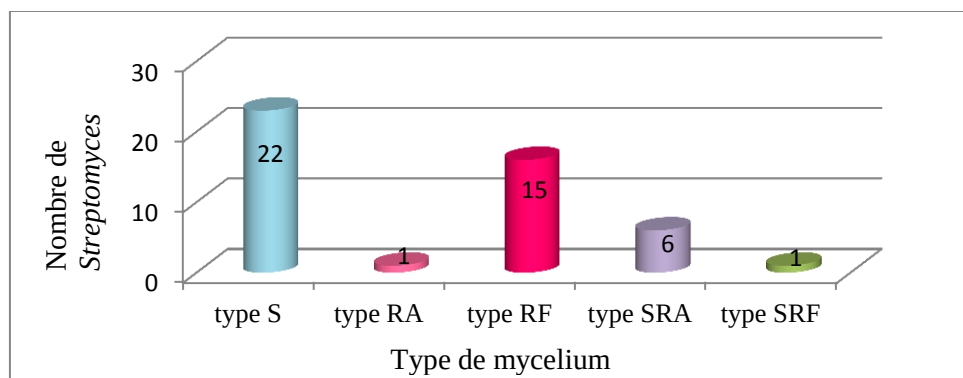


Figure 6. Distribution des *Streptomyces* selon le type du MA.

La majorité des isolats de *Streptomyces* ont montré une bonne croissance sur les deux milieux testés, avec une meilleure croissance sur le milieu ISP2. Ces isolats sont caractérisés par la présence d'un MA de couleur très varié (gris, jaune, blanc, beige, rose, rouge, bleu, vert, violet). Le MS présente des couleurs différentes mais pour la majorité il est coloré en beige et pour certains d'entre eux en jaune, brun, violet et rose. Les PS sont sécrétés uniquement chez certains isolats, avec des couleurs dominantes : le brun, rose, le jaune, orange, rouge.

3.1. Isolats de type S (groupe G1)

22 isolats (soit 48,88%) ont été rattachés au type S de *Streptomyces* sur la base des caractéristiques micromorphologique. Ces isolats présentent un MA bien développé sur les deux milieux et qui portent des chaînes de spores de 5 à 50 portés par un sporophores, et présentent un nombre de spires qui varie entre 2 à 6 tours sur ISP2, et d'environ 1 à 8 tours sur ISP4. Ces isolats présentent une sporulation abondante et nette (figure 7).

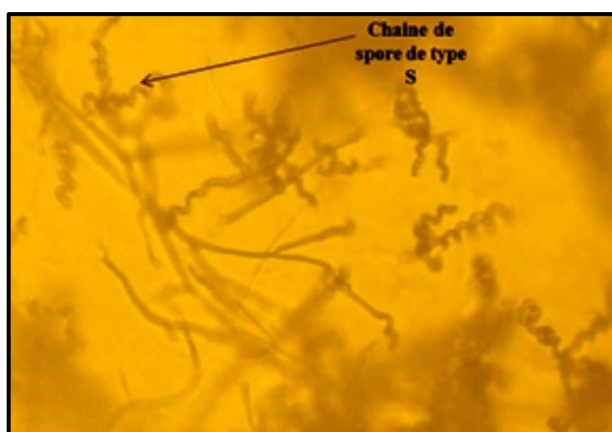


Figure 7. Micromorphologie du MA de l'isolat LS17 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).

Ce groupe se caractérise par une bonne croissance sur les deux milieux testés en particulier l'ISP2 pour l'ensemble des isolats. La couleur du MA est grise pour la plupart des isolats, mise à part quelques isolats dont le MA est beige blanchâtre, bleu ou encore jaunâtre. La couleur du MS sur les deux milieux testés est variable d'un isolat à un autre. La production de PS a été observée chez uniquement 8 isolats (tableau 9, figure 8).

Tableau 9. Caractéristiques culturelles des *Streptomyces* du type S.

Sous-groupe	Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
G1-1	LS1, LS6, LS8 et LS19	ISP2	+++	Gris clair	Beige	-
		ISP4	++	Gris clair	Beige à Brun	-
G1-2	LS2, LS11 et LS10	ISP2	++	Gris à Gris olivacé	Brun foncé	Brun olivacé
		ISP4	++	Gris moyen	Brun à rouge	Brunâtre
G1-3	NS1, BS6, LS15, LS14 et HS2	ISP2	+++	Gris foncé	Beige clair	-
		ISP4	++	Gris clair	Non coloré	-
G1-4	NS3 et LS16	ISP2	++	Beige	Beige brun	-
		ISP4	++	Beige	Jaune brunâtre	-
G1-5	AS2	ISP2	+++	Gris clair	beige	-
		ISP4	++	Gris clair	Jaune très très vif	Orange
G1-6	LS22	ISP2	++	Beige	Beige à Beige clair	-
		ISP4	++	Blanchâtre à beige	Jaune orangé vif	-
G1-7	LS9	ISP2	+++	Beige clair	Jaune clair	-
		ISP4	++	-	Beige brunâtre	-
G1-8	NS4	ISP2	+++	Gris moyen	Brun moyen	Brun miel
		ISP4	+++	Gris clair à moyen	Brun pale à clair	Brunâtre
G1-9	LS17	ISP2	+++	Bleu grisâtre	Brun moyen	-
		ISP4	++ à +++	Bleu clair	Brun jaunâtre	-
G1-10	TS2	ISP2	++ à +++	-	Rose à violet très vif	-
		ISP4	+ à ++	-	Rose à violet clair	Rose violacé
G1-11	BS8	ISP2	+++	Gris rosâtre	Jaune orangé +/- vif	Jaune à rouge
		ISP4	++	Gris rosâtre	Jaune clair	Jaune à orange
G1-12	LS21	ISP2	+++	Gris moyen	Violet	Orange
		ISP4	++ à +++	Gris moyen	Verdâtre	-

MA = mycélium aérien, **MS** = mycélium du substrat, **PS** = pigments solubles, - = absence de pigments solubles, + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance, ++++ = très bonne croissance.

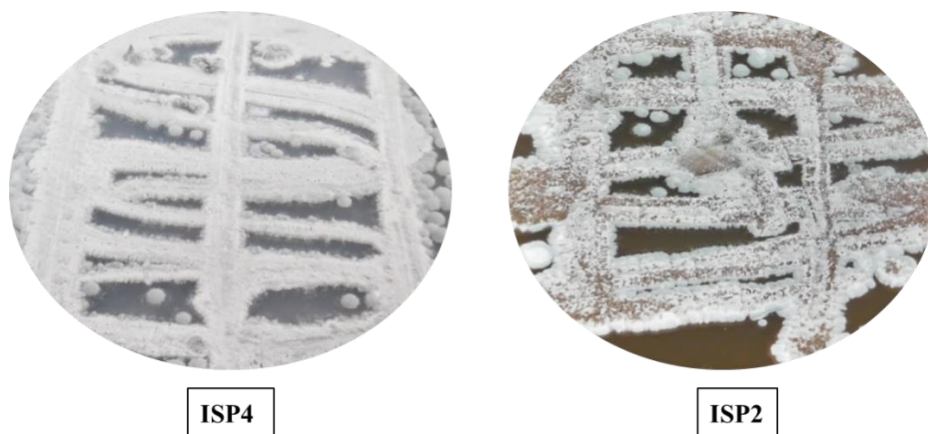


Figure 8. Aspect du MA de l'isolat LS17.

3.2. Isolats de type RF (groupe G2)

Ce groupe comprend 15 isolats (soit 33,33%) ayant montré les caractéristiques micromorphologiques des *Streptomyces* de type RF. Ces isolats comportent un MS qui ne se fragmente pas surmonté par un MA qui porte des chaînes de 5 à 30 spores (figure 9).

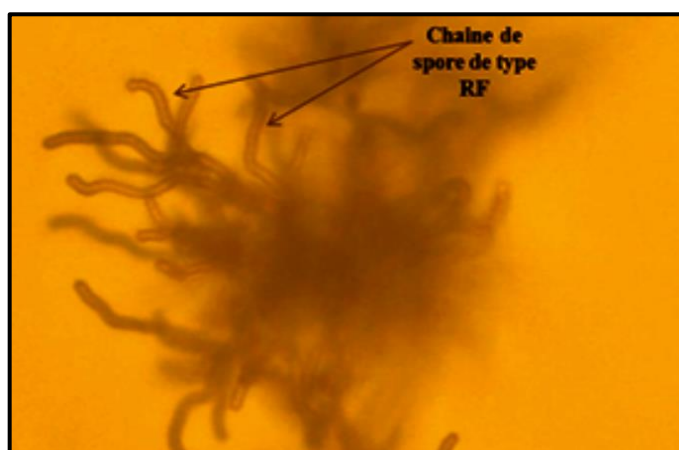


Figure 9. Micromorphologie du MA de l'isolat AS3 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).

Les souches de ce groupe se caractérisent par une bonne croissance sur les deux milieux testés avec un MA de couleur jaune grisâtre pour la plupart des isolats. Tandis que la couleur du MS est soit beige soit brune selon les milieux. Les deux souches NS5 et NS6 produisent sur le milieu ISP4 un PS de couleur brunâtre (tableau 10, figure 10).

Tableau 10. Caractéristiques culturelles des *Streptomyces* du type RF.

Groupe	Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
G2-1	BS3, BS4, TS1, HS1, LS5, LS12, LS13, LS18 et AS1	ISP2	++ à +++	Jaune grisâtre	Brun clair	-
		ISP4	++	Jaune grisâtre	Beige	-
G2-2	BS2 et AS3	ISP2	+++	Gris	Beige	-
		ISP4	++	Blanc	Beige	-
G2-3	BS5, et LS4	ISP2	+++	Non coloré	Beige	-
		ISP4	++	Non coloré	Beige	-
G2-4	NS5 et NS6	ISP2	+++	Jaune grisâtre	Brun	brun
		ISP4	++	Jaune grisâtre	Brun olive	brun
G2-5	NS2	ISP2	++	Gris pale	Brun moyen	-
		ISP4	+++	Gris clair à moyen	Brunâtre pale	-

MA = mycélium aérien, **MS** = mycélium du substrat, **PS** = pigments solubles, - = absence de pigments solubles, + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance, ++++ = très bonne croissance.



ISP4



ISP2

Figure 10. Aspect du MA de l'isolat AS3.

3.3. Isolats de type RA (groupe G3)

Un seul isolat (AS1) (soit 2,22%) de *Streptomyces* a été classé sur la base des caractéristiques micromorphologiques dans le groupe des *Streptomyces* de type RA. Il présente des chaînes de spores, de 5 à 20 spores, portées par un sporophore bien développé (figure 11).

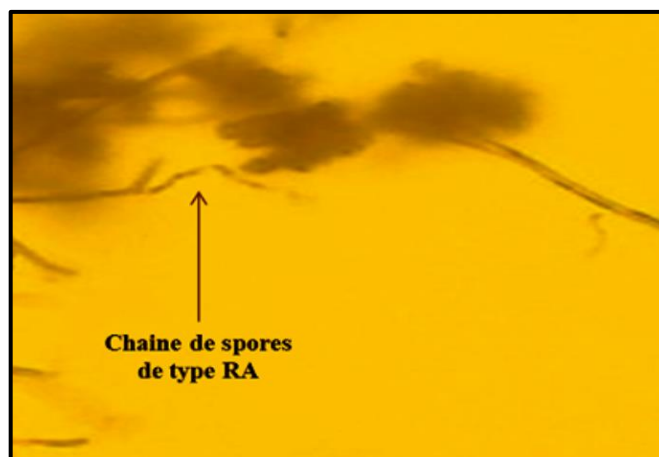


Figure 11. Micromorphologie du MA de l'isolat AS1 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).

Ce groupe est représenté par un seul isolat (AS1) dont la croissance est bonne sur les deux milieux ISP2 et ISP4. Cet isolat se caractérise par un MA de couleur gris clair et un MS beige sans production de PS. (tableau 11, figure 12).

Tableau 11. Caractéristiques culturelles de l'isolat AS1.

Groupe	Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
G3-1	AS1	ISP2	+++	Gris clair	Beige pale à	-
		ISP4	++ à +++	Gris clair	Beige pale	-

MA = mycélium aérien, **MS** = mycélium du substrat, **PS** = pigments solubles, - = absence de solubles, + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance, ++++ = très bonne croissance.

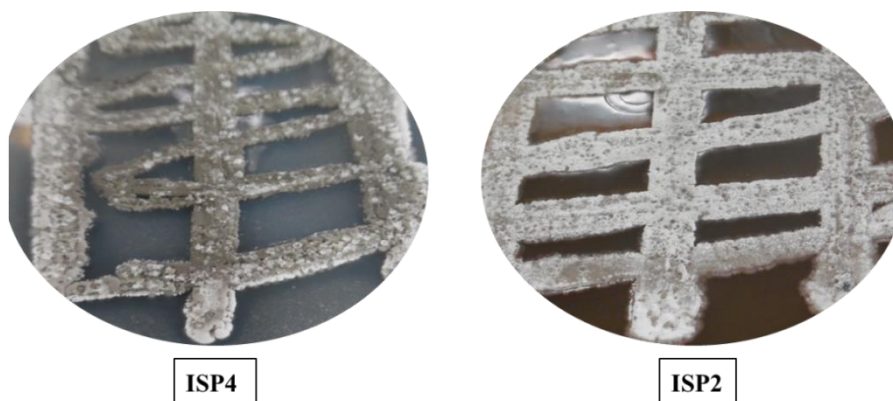


Figure 12. Aspect du MA de l'isolat AS1.

3.4. Isolats de type SRA (groupe G4)

Sur la base de leur caractéristiques micromorphologiques nous avons pu rattacher 6 isolats (soit 13,33%) au *Streptomyces* de type SRA. Ces isolats présentent un MA avec des chaînes de 3 à 20 spores sur ISP2 et de 5 à 50 spores sur ISP4. Le nombre de spires varie de 1 à 4 avec des pseudo-verticilles sur le milieu ISP2 et de 1 à 8 sur le milieu ISP4. Ces isolats présentent parfois un MA au bord stérile, mais fortement dense et compacte sur le milieu ISP4 (figure 13).



Figure 13. Micromorphologie du MA de l'isolat JS1 sur le milieu ISP4 observée au microscope photonique (grossissement 400 avec effet de zoom).

Tous les isolats de ce groupe présentent une bonne croissance sur le milieu ISP2 et une croissance moyenne sur le milieu ISP4 avec des couleurs variables pour le MA et le MS. Un seul isolat produit un PS de couleur brune (tableau 12, figure 14).

Tableau 12. Caractéristiques culturelles des *Streptomyces* du type SRA.

Groupe	Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
G4-1	LS20, LS3, et JS1	ISP2	+++	Gris clair	Brun jaunâtre	-
		ISP4	++	blanc	Beige clair	-
G4-2	BS7	ISP2	+++	Gris olivacé	Jaune pale	-
		ISP4	++	Gris olivacé clair	Jaune pale	-
G4-3	NS7	ISP2	++++	Rose-beige	Beige à brun	Traces brunâtre
		ISP4	+++	Jaune rosâtre beige	Jaune orange	Traces brunâtre
G4-4	LS7	ISP2	+++	Beige rosâtre	Brun vif	-
		ISP4	++	Beige rosâtre	Brun jaune	-

MA = mycélium aérien, MS = mycélium du substrat, PS = pigments solubles, - = absence de pigments solubles, + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance, ++++ = très bonne croissance.

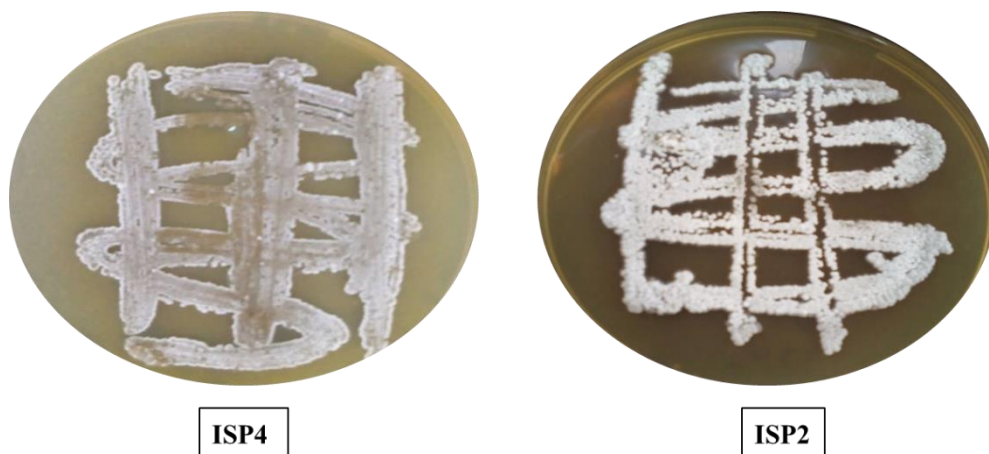


Figure 14. Aspect du MA de l'isolat JS1.

3.5. Isolat de type SRF (groupe G5)

Sur la base de leur caractéristiques micromorphologiques nous avons pu classer un seul isolat (soit 2.22%) (BS1) dans le groupe de *Streptomyces* de type SRF. Cet isolat possède un MA avec des chaînes de spores de type RF, et parfois de type S. Le nombre de spore varie de 10 à 30 spores sur ISP2 et de 10 à 50 spores sur ISP4. Le nombre de spires varie selon les milieux de culture: de 1 à 2 tours sur ISP2 et de 2 à 6 tours sur ISP4 (tableau 10, figure 15).

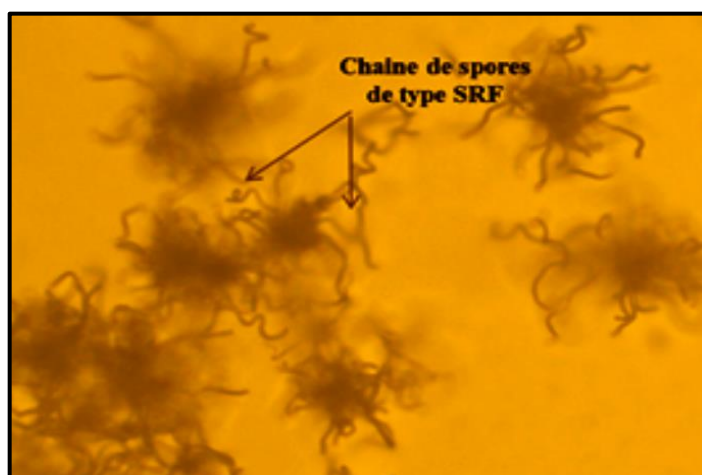


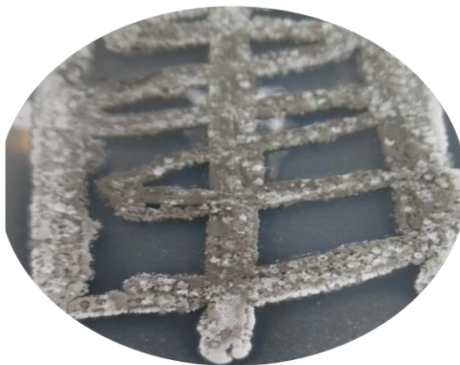
Figure 15. Micromorphologie du MA de l'isolat BS1 sur le milieu ISP2 observée au microscope photonique (grossissement 400 effet de zoom).

Ce groupe contient un seul isolat (BS1) qui se développe bien sur les deux milieux avec un MA gris et un MS jaune clair sans production de PS (tableau 13, figure 16).

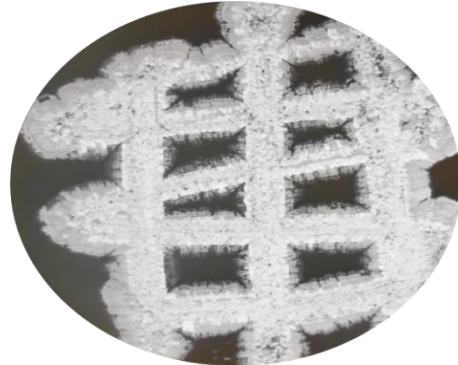
Tableau 13. Caractéristiques culturelles du l'isolatFBS8.

Groupe	Isolats	Milieux	Croissance	MA	MS	PS
G5-1	BS1	ISP2	+++	Gris	Jaune clair	-
		ISP4	++	Gris	Jaune clair	-

MA = mycélium aérien, **MS** = mycélium du substrat, **PS** = pigments solubles, - = absence de pigments solubles, + = croissance faible, ++ = croissance moyenne, +++ = bonne croissance, ++++ = très bonne croissance.



ISP4



ISP2

Figure 16. Aspect du MA de l'isolat BS1

Discussion

Le choix de biotope marin comme foyer de recherche est basé sur les résultats intéressants obtenus par plusieurs chercheurs qui ont montré la richesse et la diversité de ce biotope en actinobactéries, qui parfois dépassent les autres groupes de microorganismes en densité (Goodfellow and Haynes, 1984 ; Barcina *et al.*, 1987; Pisano *et al.*, 1992; Jensen *et al.*, 1991). En effet, peu d'études ont été dirigées spécifiquement sur les actinobactéries marines, mais les preuves disponibles confirment une grande diversité taxonomique et distributions à travers les habitats marins (Weyland, 1981; Goodfellow et Haynes, 1984; Takizawa *et al.*, 1993). En Algérie, seuls les travaux de Boucheffa (2011), Djinni (2014) et Melouk (2016) ont porté sur la diversité des actinobactéries dans les milieux marins. L'ensemble de ces travaux ont suggéré que ces habitats peuvent être utiles pour l'isolement d'un nombre important d'actinobactéries à potentiel élevé pour la production de nouveaux composés.

La présence des *Streptomyces* dans des échantillons d'eau et de sédiments marins a été rapportée par plusieurs auteurs: Grein et Meyers (1958); Walker et Colwell (1975); Barcina *et al.* (1987); Jensen *et al.* (1991); SivaKumar (2001).

L'isolement des *Streptomyces* marins est effectué sur des milieux de culture à base chitine et incubé à 30°C pendant 2 à 4 semaines. Ces milieux sont préconisés par différents auteurs pour l'isolement des actinobactéries (Hayakawa et Nonomura, 1984; Boudjella, 1994; Pathom-aree *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2010). Ils contiennent un mélange des vitamines du groupe B utilisé comme facteurs de croissance et cela permet aux genres relativement rares et qui sont souvent auxotrophes pour ces vitamines de croître (Hayakawa et Nonomura, 1984). Ce milieu est à base de chitine comme unique source de carbone et d'azote. Ainsi ce substrat est considéré comme l'élément sélectif qui favorise la croissance (Domergues et Mangenot, 1970). En effet, les actinobactéries dégradent mieux la chitine par rapport aux autres microorganismes qui la dégradent difficilement ou pas. Nous avons utilisé dans cette étude deux milieux différents dans le but d'avoir des isolats de *Streptomyces* qui pourraient être fortement antagoniste. Le milieu M1 (milieu à base d'eau distillé contenant des sels minéraux) a permis de sélectionner un taux élevé de *Streptomyces*, contrairement au milieu M2 (milieu à base d'eau de mer sans ajout de sels minéraux) qui a révélé un taux assez faible de *Streptomyces*. Nos résultats concordent avec les travaux réalisés par Ramesh et mathivanan (2009) qui ont isolé 168 souches d'actinobactéries uniquement à partir de 172 échantillons de sédiments marins en utilisant un milieu à base d'eau de mer. En outre, le nombre restreint de souches de *Streptomyces* obtenu sur le milieu M2 suggèreraient que ces dernières sont à l'origine des souches terricoles qui ont été déversées dans la mer. Cette suggestion est

confortée par le fait que nos échantillons sont proches de la côte (environ 1-100 mètre). Ces deux milieux contiennent également l'actidione (antifongique) et l'acide nalidixique ce qui favorise la diversité des isolats et l'élimination ou diminution du nombre de bactéries non mycéliennes indésirables (Boudjella, 1994; Sabaou *et al.*, 1998).

Des travaux réalisés dans le monde ont constatés que l'isolement des *Streptomyces* des milieux marins est caractérisé toujours par un nombre restreint des isolats, ces chiffres relativement faibles peuvent être dus à la profondeur des stations d'échantillonnage (Weyland, 1981). Cette suggestion est confortée par le rapport de Chandramohan *et al.* (1986), qui n'a enregistré aucune colonie de *Streptomyces* à partir des sédiments d'origine de l'océan indien même en utilisant des milieux sélectifs. Cependant cette constatation n'argumente pas notre cas, car nos prélèvements proviennent des côtes.

Notre étude a révélé que 45 isolats de *Streptomyces* ont été retrouvés dans les sept échantillons analysés ce qui confirme les résultats intéressants obtenus par Omura, (1992) qui a trouvé que le genre *Streptomyces* est le plus fréquemment enregistré. De même, les *Streptomyces* représentaient environ 90% à 95% des actinobactéries retrouvées dans les divers biotopes marins (Lechevalier, 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1967). Ellaiah et Reddy (1990) ont isolé des *Streptomyces* à partir des sédiments marins et ont signalé la prédominance du genre *Streptomyces* avec un pourcentage de 20%. Cependant Sponga *et al.* (1999) ont rapportés que les sédiments marins ont donné une moyenne d'actinobactéries isolées de 50% du genre *Streptomyces* et 50% d'actinobactéries rares, y compris *Micromonospora*. Contrairement aux résultats précédents, Jensen *et al.* (1991) et Mincer *et al.* (2002) ont travaillé sur les sédiments marins et ont signalé que le genre *Micromonospora* est prédominant. Nos résultats confirment que les *Streptomyces* sont dominants dans les sédiments marins.

Les 45 isolats de *Streptomyces* poussent et sporulent bien sur les deux milieux testés ISP2 et ISP4. Ces deux milieux favorables sont riches en sources de carbone et d'azote. Ce qui facilite la croissance des *Streptomyces* et leur sporulation rapides en une période de 10 jours. Il faut rappeler que les *Streptomyces* sont connues pour leur bonne croissance sur ces milieux grâce à la production d'une large gamme d'enzymes telles que : les amylases, les protéinases, les pectinases, les glycosidases, etc (Solanki *et al.*, 2008). La plupart des isolats possèdent un MS non fragmenté surmonté par un MA qui produit des chaînes de spores portés par un sporophore plus ou moins variable selon les isolats (S, RA, SRA, RF, SRF), ce qui correspond à nos isolats de *Streptomyces*. (Locci, 1989 ; Holt *et al.*, 1994).

En tenant compte de la couleur du MA, la plupart des isolats sont classés dans la série des *Streptomyces* gris et *Streptomyces* beige, nous rappelons que ces dernières séries représentent

près de 40%des 500 espèces de *Streptomyces* décrites dans le manuel de Bergey de 1994 (Holt *et al.*, 1994).

Conclusion et perspectives

Vu l'émergence de la résistance de *Staphylococcus aureus* vis-à-vis de différentes familles d'antibiotiques qui a augmentée de manière alarmante ces dernières années, la recherche de nouvelles sources d'antistaphylococciques s'impose dans ce contexte. L'investigation des actinobactéries, en particuliers le genre *Streptomyces*, dans les milieux marins constitue un axe de recherche potentiel.

Notre travail s'inscrit dans ce cadre en recherchant des *Streptomyces* dans les sédiments marins du littoral algérien, ainsi que l'étude de l'activité antistaphylococcique des souches isolées.

Notre étude a été réalisée sur 7 échantillons provenant de différentes côtes d'Algérie (Staouali, Aïn Taya, Aïn Témouchent, Ténès, Béjaïa, Jijel, et Annaba). L'isolement des actinobactéries sur les milieux M1 et M2 a permis d'obtenir 45 isolats. Leur caractérisation morphologique a permis de les rattacher à 5 types de *Streptomyces* selon l'organisation de chaînes de spores.

L'étude du profil de résistance des 7 souches de *S. aureus*, montrent des niveaux de résistance différents vis-à-vis plusieurs familles d'antibiotiques (où les *S. aureus* testés présentaient le pourcentage le plus élevé de résistance contre toutes les β -lactamines). Parmi les *S. aureus* testés, la souche SaF présente une forte résistance à plusieurs familles d'antibiotiques testées. La sensibilité des souches de *S. aureus* est à signaler pour le reste des familles d'antibiotiques antistaphylococcique testées.

L'étude du pouvoir antagoniste des souches de *Streptomyces* a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar, contre les 7 souches *S. aureus*. Les résultats de l'antagonisme ont révélé un potentiel important des souches à produire des molécules bioactives. En effet sur les 45 souches de *Streptomyces*, 31 ont montré une activité contre au moins une souche de *S. aureus* testées, et les autres ont une activité moyenne à faible. En revanche 14 souches n'ont présenté aucune activité. Parmi les souches actives, (souches (NS2, BS1, BS7, TS2, et AS2) ont montré de bonnes activités contre toutes les souches de *S. aureus* testées.

Il est intéressant de noter que 14 souches de *Streptomyces* sont actives contre la Sa6, qui est multirésistant, en particulier les souches, BS7, BS1, AS2, qui possèdent une forte

activité contre elle. Ces dernières peuvent être une source prometteuse de nouvelles molécules bioactives antistaphylococciques.

Notre travail confirme une autre fois que le milieu marin est une source potentielle de point de diversité des *Streptomyces* et activité antibactérienne. L'exploitation de ce potentiel pourrait répondre au besoin accru des antibiotiques surtout contre les SARM et les BMR.

Le travail effectué ouvre des perspectives multiples qui concernent :

- o Du point de vue taxonomique, il serait nécessaire d'identifier avec exactitude les souches isolées en étudiant les caractéristiques physiologiques, chimiotaxonomiques et moléculaires, notamment l'analyse du gène codant pour l'ARNr 16S et l'hybridation ADN-ADN afin de déterminer avec exactitude le rang hiérarchique.
- o Etudier les métabolites secondaires bioactives qui sont sécrétés par les 5 souches de *Streptomyces* qui peuvent être une source de molécules efficaces contre le *S. aureus* résistant aux différentes familles d'antibiotiques.
- o La recherche des activités biologiques, autre que les antibiotiques, des souches actives telles que les activités antitumorales et antiparasitaires.

Introduction

Synthèse bibliographique

Matériel et méthodes

Résultats et discussion

Conclusion et perspectives

Annexes

Références bibliographiques

Introduction

Les actinobactéries sont des procaryotes très recherchées en biotechnologie à cause de leur rôle important dans la production des composés bioactifs. Ce groupe de bactéries a fourni un nombre considérable d'enzymes, de composés antitumoraux, d'agents immunosuppresseurs, d'insecticides, d'antiparasites, d'herbicides, d'antioxydants et surtout d'antibiotiques (Solanki *et al.*, 2008). Elles continuent toujours à être une source précieuse de ces molécules. Ces microorganisme et surtout ceux qui ont une structure mycélienne, sont réputés pour la production d'antibiotiques en particuliers le genre *Streptomyces* qui sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne (Solecka *et al.*, 2012). Ce genre continue d'intéresser de nombreux laboratoire dans le monde (Ray *et al.*, 2016 ; Akhwale *et al.*, 2015).

Les chercheurs s'évertuent à isoler perpétuellement de nombreuses souches d'actinobactéries de divers milieux, surtout les milieux aquatique et terrestre où les conditions de vie sont très difficiles (Williams *et al.*, 1983; Stach et Bull, 2005). L'identification dans ces milieux accroît la possibilité de découvrir de nouveaux taxons et également de nouvelles molécules bioactives ayant des activité intéressantes (Solecka *et al.*, 2012).

Le phénomène de la multirésistance des *Staphylococcus aureus* pathogènes aux antibiotiques ne cesse malheureusement de progresser et continue aujourd'hui de causer de véritable problèmes cliniques et échecs thérapeutiques. En Algérie, comme ailleurs dans le monde, plusieurs travaux publiés ont signalé l'apparition de nouvelles souches bactériennes multirésistantes aux antibiotiques cliniquement utilisés, dont certains sont des molécules très récentes (3^{ème} et 4^{ème} génération d'antibiotiques) (Paterson, 2006; Touati, 2006; Aggounet *al.*, 2008; Messaïet *al.*, 2008; Okesola et Makanjuola, 2009).

Cela nous a incité à rechercher des isolats de *Streptomyces* à partir de sédiments marins provenant de sept côtes du littoral algérien, de les caractérisés partiellement et d'évaluer leur action antagoniste contre sept souches de *Staphylococcus aureus* dont le profil de résistance a été déterminé.

Ce travail est présenté en trois parties :

- La première partie est réservée à une analyse bibliographique portant sur les différents aspects abordés dans ce mémoire, à savoir, la définition des actinobactéries en spécifiant le genre *Streptomyces* du point de vue taxonomique, propriétés et intérêt.
- La deuxième partie est consacrée à la description du matériel et des méthodes utilisés.
- Dans la troisième partie, les résultats sont présentés et discutés. Ils concernent tout d'abord l'isolement des *Streptomyces*, la purification et la conservation des isolats sélectionnés, leur identification partielle et enfin l'évaluation de leur activité bactérienne.

A

Aggoune N., Bensersa D., Henniche F.Z., Daoudi M., Abdouni M.A., Chabani A., Tiouit D., Naim M. (2008). Metallo-beta-lactamases producing *Pseudomonas aeruginosa* in Algeria. *Med Mal Infect.*, 39:413-414.

Akhwale J.K., Goker M., Rohde M., Sproer C., Schumann P., Klenk H.P., Boga H.I. (2015). *Streptomyces alkaliphilus* sp. Nov., isolated from sediments of Lake Elmenteita in the Kenyan Rift valley. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 107(5):1243-1259.

Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. (2012). Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine marine contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *J Myc Med.*, 22:42-51.

Anzai K., Ohno M., Nakashima T., Kuwahara N., Suzuki R., Tamura T., Komaki H., Miyadoh S., Harayama S., Ando K. (2008). Taxonomic distribution of *Streptomyces* species capable of productiong bioactive compounds among strains preserve dat. *Appl Microbiol Biotech.*, 80:287-295.

Athalye M., Goodfellow M., Lacey J., White R.P. (1985). Numerical classification of *Streptomyces* and *Nocardiosis*. *Int J Syst Bacteriol.*, 35(1):86-98.

B

Badji B., Mostafaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E., Tillequin F. (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J Ind Microbiol.*, 34:403-412.

Barcina I., Iriberry J., Egea L. (1987). Enumeration, isolation and some physiological properties of actinomycetes from sea water and sediment. *Syst Appl Microbiol.*, 10:85-91.

Becker B., Lechevalier M.P., Lechevalier H.A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form genera of aerobic actinomycetes. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 13:236-242.

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.P. 1750 p.

Birgand G., Lucet J.C. (2013). Politque de dépistage quand qui faut-il dépister. *Rev franco lab.*, N°453.

Boucheffa K. (2011). Criblage de souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques : Identification des souches productrices et essai de caractérisation des antifongiques produits. These de Magister En microbiologie appliquée aux substances antimicrobiennes. Université Abderrahmane Mira de Bejaia., 90p.

Boudjella H. (1994). Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du prétraitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes .Thèse de Magister en Microbiologie. Ecole normal superieur de Kouba., 175 p.

Boudjella H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptomyces*. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique d'El- Harrach., 188p.

Boukhalfa Bennai S.A., Serradj S. (2016). Les infections bactériennes dans un service d'orthopédie : isolement, identification et profil de résistance. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master. Université de Blida., 90p.

Bouznada K. (2018). *Saccharotrix* et *Streptomyces* de la region Du M'ZAB: Isolement, taxonomie et mise en evidence de nouvelle espèce et production d'antibiotiques contre divers microorganismes phatogène.Thèse de doctorate science biologique. Ecole normal superieur de Kouba., 252 p.

C

Caillon J., Hamel A., Jaqueline C., Batard E., Boutoille D., Bugnon D., Miegerville A.F., Rogez J.M., Potel G. (2008). Intermittent active motion versus immobilization in the treatment of *Staphylococcus aureus* induced arthritis in a rabbit model. J Child Orthop., 2:491-5.

Chandramohan D., Loka Bharathi P.A., Nair S., Matondkar S.G.P. (1986). Bacteriology of ferromanganese nodules from the Indian Ocean. J Geomicrobiol., 5:17-31.

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

Chavan Dilip. V., Mulaje. S.S., Mohalkar. R.Y. (2013). A review on actinomycetes and their biotechnological application. Int J Pharm Sci Res., 4:1730-1742.

Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie, Communiqué (2008), Société française de microbiologie, Paris, France, <http://www.sfm.asso.fr/>.

D

Daurel C., Leclercq R. (2008). L'antibiogramme de *Staphylococcus aureus*. Rev franco lab., N°437.

Demain A.L., Salomon N.A. (1986). Manual of industrial microbiology and biotechnology. American Society for Microbiology Press., Washington., 766p.

Djinni I. (2014). Caractérisation des métabolites secondaires bioactifs de deux souches d'actinomycètes isolées des biotopes marin et tellurique., Thèse de Doctorat. Université A.MIRA-BEJAIA., 273p.

Dommergues Y., Mangenot F. (1970). Ecologie microbienne de la mér. Masson et Cie (Eds.) Paris.

Draghi D.C., Jone M.E., Thornsberry C., Karlowsky J.A. Sahm D.F., Wenzel R.P. (2004). Emerging resistance among bacterial pathogens in the intensive care unit-a European and North American Surveillance study (2000-2002). *Ann Clin Microbiol.*, 3:14.

Driche E.H. (2016). Isolement, taxonomie et caractérisation des molécules bioactives d'actinobactéries antagonistes de *Staphylococcus aureus*. Thèse de doctorat. École Normale Supérieure de Kouba, Alger. 162 p.

Dyson P. (2011). *Streptomyces* Molecular biology and Biotechnology., Caister Academic Press Royaume-Uni., 1-260p.

E

Ellaiah P., Reddy A.P.C. (1990). Isolation of actinomycetes from marine sediments off Visakhapatnam, east coast of India. *Indian J Mar Sci.*, 16:134-135.

EUCAST. (2013). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. www.eucast.org Site Web visité en novembre 2013.

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

F

Fischer A., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. (1983). Molecular genetic and chemotaxonomic studies on *Streptomyces*. *J Gen Microbiol.*, 129:3433-3446.

Frommer, W. (1959). Zur Systematik Der Actinomycin Bildenden Streptomyceten. *Arch Mikrobiol.*, 32:187-206.

G

Gazenko S.V., Reponen T.A., Grinshpun S.A., Willeke K. (1998). Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl Env Microbiol.*, 64(11):4410-4415.

Ghanem N.B., Sabry S.A, El-Sherif Z.M., Abu El-Elal G.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol.*, 46(3):105-111.

Goodfellow M., Hayenes J. A. (1984). Actinomycetes in marine sediments. In: Oritz-Oritz, L., L. F. Bojalil and V. Yakoleff eds. *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*. Academic Press New York, London., 453-472p.

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

Gottlieb D. (1973). General considerations and implications of the actinomycetes. In: *Actinomycetales: Characteristics and practical importance*. Sakes G., Skinner F. A. Ed. Academic Press. New York., 1-10p.

Grein A. Meyers S.P. (1958). Growth characteristic and antibiotic production of actinomycetes isolated from littoral sediments and material suspended in seawater. *J Bacteriol.*, 76:457-463.

H

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

Hayakawa M., Nonomura H. (1984). HV agar, a new selective medium for isolation of actinomycete. Annual meeting of the actinomycetologists. Osaka. Japon., 6p.

Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (1994) In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 9^{ème} édition, Williams and Wilkins editors, Baltimore. 816p.

Hopwood D.A. (2007). *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. J Ind Microbiol Biotechnol., 30(8):468-471.

Hwang B.K., Lim S.W., Kim J.Y., Lee J.Y., Moon S.S. (2001). Isolation and in vivo and invitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. Appl Env Microbiol., 67(8):3739-3745.

I

Isabelle A., Didier C. (2015). Guide d'échantillonnage. Opération des échantillons en milieu marin dans le cadre de programme de surveillance DCE (matrice, eau, sédiment et biote)., 13p.

J

Jensen P.R., Dwight R., Fenical W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl Env Microbiol., 57(4):1102-1108.

K

Kelly K.L., Judd D.B. (1976). Color. Universal language and dictionary of names (National Bureau of Standards Special Publication 440). Washington, DC: US Department of Commerce.

Khattabi A., Hilali L., Dari K., Assobhei O., Gavini F. (2002). Isolement de microorganismes d'origine marine (Maroc) antagonistes de *Yersinia ruckeri* et *Yersinia pseudotuberculosis*. Rev Biol Biotech., 2:28-32.

Khiev B., Veber B. (2010). Patient BMR : risques de contamination et prévention en préhospitalier et aux urgences, Le 52^e congrès national d'anesthésie et de réanimation. Infirmiers. Infirmier(e)s d'urgence Sfar., 12p.

Kim M., Oh H.S., Park S.C., Chun J. (2014). Towards a taxonomic coherence between average nucleotide identity and 16SrRNA gene sequence similarity for species demarcation of prokaryotes. Int J Syst Evol Microbiol., 64:346-351.

Kohanski M.A., Dwyer D.J., Collins J.J. (2010). How antibiotics kill bacteria. Net Rev Microbiol., 8(6):423-35.

Kuroda M., Ohta T., Uchiyama I. (2001). Whole genome sequencing of meticillin resistant *Staphylococcus aureus*. THE LANCET., 357:1225-40.

L

- Lechevalier H.A. (1964).** The actinomycetes. In: Henkeleka H. and N. C. Dondero Ed. Principles and Application in Aquatic Microbiology. John Wiley, New York., 230-253p.
- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1967).** Biology of actinomycetes. Ann Rev Microbiol., 21: 71-100.
- Lechevalier M. P., Lechevalier H.A. (1970).** Composition of whole-cell hydrolysates as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. In: The Actinomycetales. Prauser H. Ed. G. Fisher Verlag, Jena, 311-316.
- Lechevalier M.P., De bièvre C., Lechevalier H.A. (1977).** Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. Biochem Syst Ecol., 5:249-260.
- Lechevalier H.A., Lechevalier M.P. (1981).** Introduction to the order *Actinomycetales*. In: The prokaryotes, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Ed. Springer - Verlag, Berlin., 1915-1922.
- Leclercq R. (2002).** Résistance des staphylocoques aux antibiotiques. Ann Fr Anesth., Rev Réanim., 21(5):375-383.
- Locci R. (1989).** *Streptomyces* and related genera. In: Bergey's Manuel of Systematic Bacteriology, Williams and Wilkins Company., 4:2401-2508.
- Lewis D.R., Johnson T.M., Stone N.D. (2012).** Methicilline resistant *Stapylococcus aureus*(MRSA) nasal carriage in resident of veterans affairs long- term care facilities: role of antimicrobial exposure and MRSA acquisition Infect control hosp Epidemiol., 33:507-551.

M

- Macherla V.R., Liu J., Bellows C., Teisan S., Lam K.S., Potts B.C.M. (2005).** Glaciapyrroles A, B and C, pyrrololosquiterpenes from a *Streptomyces* sp. isolated from an Alaskan marine sediment. J Nat Prod., 68:780-783.
- Mariat F., Sebald M. (1990).** Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Ed. Médecine Science. Flammarion. France.
- Maskey R.P., Halmke E., Kayser O., Fiebig H.H., Maier A., Busche A., Laatsch H. (2004).** Anti-cancer and antibacterial trioxacarcins with anti-malaria activity from a marine *Streptomyces* and their absolute stereochemistry. J Nat Prod., 57:771-779.
- Melouk I. (2016).** Ioslement, caractérisation et activité antagoniste des actinobactéries de biotope marin., Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master Université de Blida1., 67p.
- Messai Y., Iabadene H., Benhassine T., Alouache S., Tazir M., Gautier V., Arlet G., Bakour R. (2008).** Prevalence and characterization of extended-spectrum b-lactamases in *Klebsiella pneumoniae* in Algiers hospitals (Algeria). Pathol Biol., 56:319-325.

Mincer T.J., Jensen P.R., Kauffman C.A., Fenical, W. (2002). Widespread and persistent populations of a major new marine actinomycete taxon in ocean sediments. *Appl Env Microbiol.*, 68:5005-5011.

N

Nagai A., Khan S.T., Tamura T., Takagi M., Shin-ya K. (2011). *Streptomyces aomiensis* sp. Nov., a novel species of *Streptomyces* isolated from marine sediment using the membrane filter method. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 6:947-950.

Nalubega F. (2016). Caractérisation polyphasique et potentiel antagoniste de quelques souches d'actinobactéries. Mémoire pour l'obtention du diplôme de Master., 13p.

Newman D.J., Cragg G.M. (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *NCBI*, 70(3):461-77.

Niakaido H. (2009). Multidrug resistance in Bacteria. *Annu Rev Biochem.*, 78:119-146.

Nonomura H., Ohara Y. (1969). Distribution of *Actinomycetes*. VI. A culture method effective for the preferential isolation and enumeration of actinomycetes strains. *J Ferm Technol.*, 474:463-469.

O

Ochi K., Haraguchi K., Miyadoh S. (1993). A taxonomic review of the genus *Microbispora* by analysis of ribosomal protein AT-L30. *Int J Syst Bacteriol.*, 43:58-62.

Okesola A.O., Mekanjuola O. (2009). Resistance to Third-Generation Cephalosporins and Other Antibiotics by *Enterobacteriaceae* in Western Nigeria. *Am J Infect Dis.*, 5(1):17-20.

Omura S. (1992). Trends in the search for bioactive microbial metabolites. *J Ind Microbiol.*, 10:135-156.

P

Parte A.C. (2014). LPSN-list of prokaryotic names with standing in nomenclature. *Nucleic Acids Res.*, 42: 613-616.

Paterson D.L. (2006). Resistance in Gram-positive bacteria: *Staphylococcaceae*. *Am J Infect Control.*, 34:20-8.

Pathom-aree W., Ward A.C., Horikoshi K., Bull A.T., Goodfellow M. (2006). Diversity of actinomycetes isolated from the Challenger Deep sediment (10898 m) from the Mariana Trench. *J Ind Microbiol.*, 10:181-189.

Pisano M.A., Sommer M.J., Tars L. (1992). Bioactivity of chitinolytic actinomycetes from marine origin. *Appl Microbiol Biotech* 36:553-555. In Hoster F., Schmitz J.E., Daniel R. (2005). Enrichment of chitinolytic microorganisms: isolation and characterization of a chitinase exhibiting antifungal activity against phytopathogenic fungi from a novel *Streptomyces* strain. *Appl Microbiol Biotech.*, 66:434-442.

Prescott L.M., Harley J.P., Klein D.A., (2010). Microbiology. Ed. Doboec., 1133 p.

R

Rahal K., Benslimani A., Tali M.H., Misoum K.F.M., Aboun A., Ammari H. (2014). Standardisation des tests de sensibilité aux antibiotiques à l'échelle national. Médecine humaine et vétérinaire., 22:177p.

Rainey F.A., Ward R.N., Kroppenstedt R.M., Stackebrandt E. (1996). The genus *Streptomyces* represents a phylogenetically coherent taxon and a distinct actinomycete lineage proposal. Int J Syst Bacteriol., 46:1088-1092.

Ramesh S., Mathivanan N. (2009). Screening of marine actinomycetes isolated from the Bay of Bengal, India for antimicrobial activity and industrial enzymes. WORLD J MICROB BIOT., 25(12) :2103-2111.

Ray L., Mishra S.R., Panda A.N., Das S., Rastougi G., Pattanaik A.K., Adhya T.K., Suar M., Raina V. (2016). *Streptomyces chitinivorans* sp. Nov., a chitinolytic strain isolated from estuarine lake sediment. Int J Syst Evol Microbiol., 66(8):3241-8.

Rapilly F. (1968). Techniques de mycologie en pathologie végétale. Ann Epiphy., 19 : 2p.

Rezenka T., Klanova K., Podojil M., Vanek Z. (1984). Fatty acids of *Streptomyces cinnamonensis*, producer of monensin. Folia Microbiol., 2:217p.

S

Sabaou N. (1988). Contribution à l'étude des actinomycètes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB. Alger.192 p.

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

Salomon C.E., Magarve N.A.Y., Sherman D.H. (2014). Merging the potential of microbial genetics with biological and chemical diversity an even brighter future for marine natural product drug discovery. Nat Prod Reports., 21:105-121.

Sanchez L.J.M., Martinez I.M., Perez B.J., Fernandez P.J.L., Canedo H.L.M. (2003). New Cytotoxic indolic metabolites from a marine *Streptomyces*. J Nat Prod., 66:863-864

Sanglier J.J., Haang H., Huck T.A., Fehr T. (1997). Novel bioactive compounds from actinomycetes: a short review (1988-1992). Res Microbiol., 144:633-642.

Sawada., Mumata K.I., Murakami T., Tanimichi H., Yamamoto S., Oki T. (1990). Calcium dependent anticandidal action of pradimicin A. J Antibiot., 43:715-721.

Schaechter M., Medoff G. (1999). Eisenstein Barry I. Microbiologie et pathologie infectieuse. De Boeck Université, Paris Bruxelles., 188-189p.

Sharif S., Singh M., Kim S.J., Shaefer J. (2009). *Staphylococcus aureus* peptidoglycan tertiary structure from carbon-13 Spin diffusion Department of Chemistry, université de Washington St Louis., 131:7023-7030.

Shirling E.B., Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int J Sys Bact., 16:3313-3340.

SivaKumar K., (2001). Actinomycetes of an Indian mangrove (Pichavaram) environment: An inventory, Ph.D. thesis, Annamalai University, 91p.

Solanki R., Khanna M., 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.

Sponga F., Cavaletti L., Lazzarini A., Borghi A., Ciciliato I., Losi D., Marinelli F. (1999). Biodiversity and potentials of marine-derived microorganisms. J Biotech., 70:65-69.

Stackebrandt E., Schumann P. (2006). Introduction to the taxonomy of Actinobacteria. Prokaryotes., 3: 297- 321p.

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

Stach, J.E., A.T. Bull. (2005). Estimating and comparing the diversity of marine actinobacteria. Antonie Van Leeuwenhoek., 87:3-9p.

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

T

Takahashi Y.K., Matsumoto A., Seino A., Ueno J., Iwai Y., Omura S. (2002). *Streptomyces avermectinius* sp. Nov., an avermectin-producing strain. Int J Syst Evol Microbiol., 52:2163-2168.

Takizawa M., Hill R. T., Colwell R. R. (1993). Isolation and diversity of actinomycetes in the Chesapeake Bay. Appl Env Microbiol., 59:997-1002.

Tian X.P., Zhang X.P., Li Q.X., Zhi X.Y., Tang S.K., Zhang S.K., Zhang S., Li W.J. (2009). *Streptomyces nanshensis* sp. Nov., isolated from the Nansha Islands in the South China Sea. Int J Syst Evol Microbiol., 59(4):745-9.

Tian X.p., Xu Y., Zhang J., Li J., Chen Z., Kim C.J., Li W.J., Zhang C.S., Zhang S. (2012). *Streptomyces oceani* sp. Nov., A new obligate marine actinomycete isolated from a deep-sea sample of seep authigenic carbonate nodule in South China Sea. Antonie Van Leeuwenhoek., 102(2):335-43.

Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L., Champs C. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 B-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. Int J Antimicrob Agents., 27:408-413.

Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N., Zitouna A. (2014). Antifungal properties of an actinomycin D- producing strains, *Streptomyces* sp. IA1., Basic Microbiol., 54: 1-8.

Tresner H.D., Davies M.C., Backus E.J. (1961). Electron microscopy of *Streptomyces* spores morphology and its role in species differentiation. J Bacteriol., 81:70-80.

U

Ueki T., Numata K.I., Sawda Y., Nishio M., Okhuma H., Toda S., Kamachi H., fukagawa Y., Oki T. (1993). Studies on the mode of antifungal action of pradimicin antibiotics. II. D-mannopyranoside binding site and clcium binding site. J Antibiot., 46:455-469.

W

Walker J.D., Colwell R.R. (1975). Factors affecting enumeration and isolation of actinomycetes from Chesapeake Bay and Southeastern Atlantic Ocean sediments. Mar Biol., 30:193-201.

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., Murry R.G.E., Stackebrandt E., Starr M. P., Trüper H.G. (1987). Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterialsystematics. Int J Syst Bacteriol., 37:463-464.

Wellington E.M., Ul-Hassan A. (2009). Actinobacteria. Encyclopedia of Microbiology Moselio Schaechter. Ed. Elsevier., 26-44p.

Weyland H. (1981). Distribution of actinomycetes on the sea floor. Zentralbl. Bakteriell. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg Abt 1suppl., 11:185-193.

Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki Ki., Parte .A. (2012) In: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2^{ème} édition, Springer, New York. Ed. Vol 5: The *Actinobacteria*.. 1750 p.

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

Woo J.H., Kitamura E., Myouga H., Kamei Y. (2002). An antifungal protein from the marine bacterium *Streptomyces* sp. Strain AP77 is specific for *Pytium porphyrae*, a causative agent of red disease in *Porphyra* spp. Appl Env Microbiol., 68 (6):2666-2675.

X

Xu Y., He J., Tian X.P., Li J., Yang L.L., Xie Q., Tang SK., Chen Y.G., Zhang S., Li W.J. (2011). *Streptomyces glycovorans* sp. Nov., *Streptomyces xishensis* sp. Nov. and *Streptomyces abyssalis* sp. Nov., isolated from marine sediments. Int J Syst Evol Microbiol., 62 (10): 2371-7.

Xu L.H., Chen Y.G., Wang Y.X., Zhang Y.Q., Tang S.K., Liu Z.X., Xiao H.D., Cui X.L., Li W. J. (2009). *Streptomycess* sp. Nov., a halophilic marine actinomycete isolated from a sea anemone. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 59:2708-2713.

Y

Yikmis M., Steinbuchel A. (2012). Historical and recent Acheivements in the field of Microbial from Karstic cave in Turkey. *Turk J Biol.*, 35:473-484.

Z

Zhang Y.Q., Liu H.Y., Chen J., Yuan L.J., Sun W., Zhang L.X., Zhang Y.Q., Yu L.Y., Li W.J. (2010). Diversity of culturable actinobacteria from Qinghai–Tibet plateau, China. *Antonie Van Leeuwenhoek.*, 98:213-223.

I. Généralités sur les actinobactéries

1. Définition des actinobactéries et classification

Les actinobactéries appelées auparavant actinomycètes sont des bactéries à Gram positif capables de former des spores asexuées (conidiospores ou sporangiospores) et des hyphes ramifiés non fragmentés ou fragmentés. Leur développement donner lieu à des colonies circulaires constituées de filaments qui irradient par croissance centrifuge tout autour du germe qui leur a donné naissance (Gottlieb, 1973; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Ceci explique leur dénomination «actinomycètes» du Grec « aktino, mycetes » ou « champignons à rayons» ou encore « champignons rayonnants » (Gottlieb, 1973). Les actinobactéries étaient classées dans l'ordre des *Actinomycetales* (Mariat et Sebald, 1990). Certains représentants de ces microorganismes, surtout les aérobies, ont longtemps été rejetés de l'ensemble des bactéries et confondus avec les champignons du fait de leur morphologie fongicoïdes (filaments ramifiés, organes de sporulation etc.) (Becker *et al.*, 1965) et de l'allure mycosique des maladies qu'ils provoquent (Gazenko *et al.*, 1998).

Ce problème est résolu grâce à la découverte de leur structure. Ce groupe de microorganismes est définitivement classé parmi les procaryotes qui sont définis actuellement comme des bactéries ayant un pourcentage G+C supérieur à 55 % (Becker *et al.*, 1965; Lechevalier et Lechevalier, 1981).

II. Taxonomie des actinobactéries

L'identification des actinobactéries est basée actuellement sur une approche polyphasique. Ainsi, la plupart des genres peuvent être définis par des critères morphologiques et chimiques, tandis que la détermination des espèces repose sur les critères physiologiques et surtout moléculaires (Bergey's Manual, 2012).

1. Critères d'identification des genres

1.1. Critères morphologiques

Les critères morphologiques sont importants pour reconnaître certains genres (*Streptomyces*) ou groupes de genres (nocardioformes). Ils consistent à apprécier et à décrire certains caractères macro et micromorphologiques.

a. Caractères macromorphologiques

Les caractéristiques culturelles des actinobactéries sont déterminées sur différents milieux de cultures. Il s'agit d'observer, à l'œil nu, la production ou non du mycélium aérien (MA) et la présence ou non de mycélium du substrat (MS), ainsi que la production ou non de pigments mélanoides. Les couleurs du MA, du MS et de celle des pigments diffusibles (en cas de production) sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Kelly et Judd, 1976).

b. Caractères micromorphologiques

Les caractères micromorphologiques sont déterminés par l'observation directe au microscope optique (et parfois électronique) des cultures poussant sur les milieux gélosés (Tresner *et al.*, 1961; Holt *et al.*, 1994). Les observations portent sur le MA et le MS. Le MA peut être stérile, fragmenté ou sporulant. Les spores sont généralement non mobiles (*Streptomyces* ect...) ou parfois mobiles (*Planomonospora* ect...), isolées ou regroupées par deux, par quatre ou en chaînes plus ou moins longues. Les spores peuvent être sessiles ou portées par des sporophores ou encore disposées de manière anarchique sur le MA. Quelques genres d'actinobactéries possèdent des structures particulières, comme les sporanges, les sclérotés ou les synnemata (*Actinosynnema*). Le MS peut être stérile ou non, fragmenté ou persistant. Il peut produire ou non des spores (mobiles ou non) ou des sporanges. La surface des spores, observée au microscope électronique, peut être soit lisse, rugueuse, épineuse ou chevelue (Demain et Solomon, 1986).

1.2. Critères chimiotaxonomique

La détermination des genres est encore renforcée par le système d'identification chimiotaxonomique. Ce système, fondé au début des années 60, a soulevé l'importance des constituants chimiques des cellules microbiennes lysées (hydrolyse acide, méthanolyse, etc.). En effet, ces constituants, qu'ils soient pariétaux, membranaires ou cellulaires (acides aminés, sucres et lipides), se sont révélés être assez stables et discriminants (tableau 1). C'est ainsi que leur analyse a permis de clarifier la position taxonomique de plusieurs genres qui était très confuse auparavant (Becker *et al.*, 1964; Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Tableau 1. Principaux critères utilisés pour la chimiotaxonomie des actinobactéries (Lechevalier et Lechevalier, 1970).

Type de composé	Structure cellulaire	Composés taxonomiquement importantes							Chimiotype	Exemple
Acides aminés	Paroi cellulaire		LL-DAP	DL-DAP	Gly	Orn	DAB	Lys		
Sucres	Cellule entière	Arabinose + xylose	-	+	+	-	-	-	II D	<i>Micromonospora</i>
		Madurose (= 3-0-méthyle galactose)	-	+	-	-	-	-	III B	<i>Actinomadura</i>
		Rhamnose + galactose	-	+	-	-	-	-	III E	<i>Saccharothrix</i>
		Arabinose + galactose	-	+	-	-	-	-	IV A	<i>Nocardia</i>
		Absence de sucres taxonomiquement importants cités ci-dessus.	+	-	+	-	-	-	I C	<i>Streptomyces</i>
			-	+	-	-	-	-	III C	<i>Nocardiopsis</i>
			-	-	-	+	-	+	V	<i>Actinomyces</i>
			-	-	-	-	-	+	VI	<i>Oerskovia</i>
			-	-	+		+	+/-	VII	<i>Agromyces</i>
			-	-	-	+	-	-	VIII	<i>Cellulomonas</i>

Suite du tableau 1.

Type de composé	Type de lipide	Structure cellulaire	Composés taxonomiquement importantes				Chimiotype	Exemples
			PE	PC	PG	PGI		
Lipides	Phospholipides	Membrane cellulaire	-	-	-	V	PI	<i>Actinomadura, Spirillospora</i>
			+	-	-	-	PII	<i>Streptomyces, Pseudonocardia, Saccharothrix</i>
			-	+	-	V	PIII	<i>Amycolatopsis, Nocardiopsis</i>
			+	-	+	-	PIV	<i>Nonomuraea, Saccharopolyspora</i>
			-	-	+	+	PV	<i>Oerskovia</i>
	Acides gras (Ag)	Membrane cellulaire	Ag saturés, Ag insaturés, iso 14/16/18 C, iso 15/17 C ; anteiso 15/17 carbones 10-méthyl cyclopropane (17/18 C)					
	Ménaquinones (MK)		MK-7, MK-8(H ₂), MK-8(H ₄), MK-9, MK-9(H ₂), MK-9(H ₄), MK-9(H ₆), MK-9(H ₈), MK-10, MK-10(H ₄), MK-10(H ₆)					

Note : PE : phosphatidyléthanolamine; PC: phosphatidylcholine; PG: phospholipides contenant de la glucosamine; PGI: phosphatidylglycérol. + : présent; - : absent; v : variable selon les genres et les espèces; orn: ornithine ; Gly: glycine; Lys: lysine; DAP : acide diaminopimélique; DAB: acide diaminobutyrique.

2. Critères d'identification des espèces

2.1 Critères physiologique

Les tests physiologiques sont utilisés pour la détermination des espèces d'actinobactéries. Ils consistent en :

- Des tests de dégradation de différents composés (glucidiques, lipidiques, protéiques, polymères complexes, stéroïdes, etc...).
- Des tests de résistance à différents agents chimiques (antibiotiques, divers autres agents chimiques).
- Des tests de croissances à différents pH, température, concentration en NaCl, etc... (Goodfellow *et al.*, 1990).

2.2. Critères moléculaires

La taxonomie actuelle exige les analyses moléculaires. Ces analyses constituent un outil fiable, puissant et obligatoire pour la proposition de nouveaux genres ou de nouvelles espèces. Elles ont permis de corriger la position taxonomique de certains genres et espèces déterminés auparavant sur la base des critères morphologiques, physiologiques et chimiques (Fischer *et al.*, 1983; Ochi *et al.*, 1993).

2.2.1. Séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S

Le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est un outil incontournable, rapide et efficace pour déterminer la position taxonomique au niveau des espèces (Rainey *et al.*, 1996). Cette analyse a été introduite dans la taxonomie des actinobactéries par Stackebrandt *et al.* (1997). Deux espèces sont considérées différentes lorsque le pourcentage de similitude est inférieur à 98,65 %. Cependant, des espèces ayant des pourcentages de similitude entre 98,65 et 100% peuvent aussi être différentes si elle présente un taux d'hybridation ADN-ADN inférieur à 70% (Kim *et al.*, 2014).

2.2.2. Hybridation ADN-ADN

Cette étude est indispensable pour l'identification définitive des espèces ayant un pourcentage de similarité du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S avec les espèces valides, supérieur ou égal au pourcentage limite de la détermination de nouvelles espèces qui est de 98,65% (Kim *et al.*, 2014). Cette méthode consiste à déterminer le pourcentage de réassociation de l'ADN génomique d'un taxon avec celui des espèces les plus proches. Deux

espèces sont considérées différentes si elles ont un taux de ressemblance de l'ADN génomique inférieur à 70% (Wayne *et al.*, 1987; Wellington et Ul-Hassan, 2009).

2.2.3. Pourcentage en Guanine –Cytosine

L'introduction du pourcentage de guanine-cytosine dans la taxonomie revient à Chargaff (1950) qui a montré que le contenu en base puriques et pyrimidiques de l'ADN peut varier entre 25 et 75% chez les bactéries. Les bactéries dont le taux en G+C diffère de plus de 5% ne peuvent pas appartenir à une même espèce et les bactéries dont le taux en G+C diffère de plus de 10% ne peuvent pas appartenir à un même genre. Cependant, des valeurs de pourcentage en G+C identiques n'impliquent pas que les bactéries soient proches entre elles car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN (Stackebrandt *et al.*, 1997; Euzéby, 2002).

III. Les actinobactéries marines

Il est prouvé que les actinobactéries forment généralement une petite fraction de la flore bactérienne dans les habitats marins. L'opinion selon laquelle des actinobactéries peupleraient normalement le milieu marin est très controversée. En effet, il est largement admis que les actinobactéries, isolées des échantillons marins, étaient en grande partie d'origine terrestre. Ce point de vue est soutenu par le constat que leur nombre dans les habitats marins diminue si les sites de prélèvements sont de plus en plus éloignés de la terre. Cependant, on considère parfois que les actinobactéries font partie de la flore marine indigène. Ainsi, il existerait bien une flore actinobactérienne propre aux sédiments marins (Chavan *et al.*, 2013), situés à plus de 4000 m de profondeur (Khattabi *et al.*, 2002). Les actinobactéries isolées des sédiments marins sont métaboliquement actifs et adaptées à la vie dans la mer, qui est localisées en deux zones, la zone côtière et celle des sédiments de fonds marins. Ainsi il a été constaté que la population d'actinobactéries et d'autres micro-organismes sont plus dense dans les mers peu profondes (Weyland, 1981). Selon Ghanem *et al.*, (2000) le nombre d'actinobactéries isolées de sédiments marins a dépassé celui isolé des eaux de mer. En plus ces sédiments sont les meilleurs fournisseurs de ces micro-organismes.

IV. Le genre *Streptomyces*

1. Définition du genre

Le genre *Streptomyces*, est le genre le plus étudié des actinobactéries de part de la production importante de métabolites secondaires. Selon l'édition de 2012 du manuel de Bergey, les *Streptomyces* appartiennent à l'ordre des *Streptomycetales* et à la famille des *Streptomycetaceae*. Les *Streptomyces* sont des organismes aérobies, à Gram positif, chimioorganotrophes, catalase positive. Ils possèdent un métabolisme oxydatif et un taux de GC compris entre 68 et 78% (Bergey's Manual, 2012). Les *Streptomyces* sont caractérisés par la présence d'un MS non fragmenté et d'un MA avec des sporophores formant des chaînes de spores (3 à 10, 10 à 50 ou plus de 50 spores par chaîne) qui peuvent être droites à flexueuses (type RF = *Rectus Flexibilis*), en crochets ou en boucles fermées (type RA = *Retinaculum Apertum* ou encore spiralées (type S = *Spira*) (figure 1). Généralement, les sporophores ne sont pas verticillés à l'exception de certaines espèces. Les *Streptomyces* produisent un grand nombre de pigments responsables des différentes couleurs du mycélium en plus des pigments diffusibles. Leur température optimale est située entre 25°C et 35°C (à l'exception des espèces thermophiles ou psychrophiles) et leur pH optimum entre 6,5 et 8 (Stackebrandt et Schumann, 2006).

Les cellules de ce genre contiennent une paroi de type IC (présence de l'isomère LL de DAP avec glycine et absence de sucres caractéristiques) (Holt *et al.*, 1994), des phospholipides membranaires de type PII (Lechevalier *et al.*, 1977) et les acides gras de type ramifiée iso et antéiso (Rezenka *et al.*, 1984). Le genre *Streptomyces* est celui qui comporte le plus grand nombre d'espèces dans le phylum des *Actinobacteria*. En effet, il compte actuellement plus de 835 espèces définies sur la base du gène codant pour l'ARN 16S et de l'hybridation ADN-ADN (Parte, 2014).

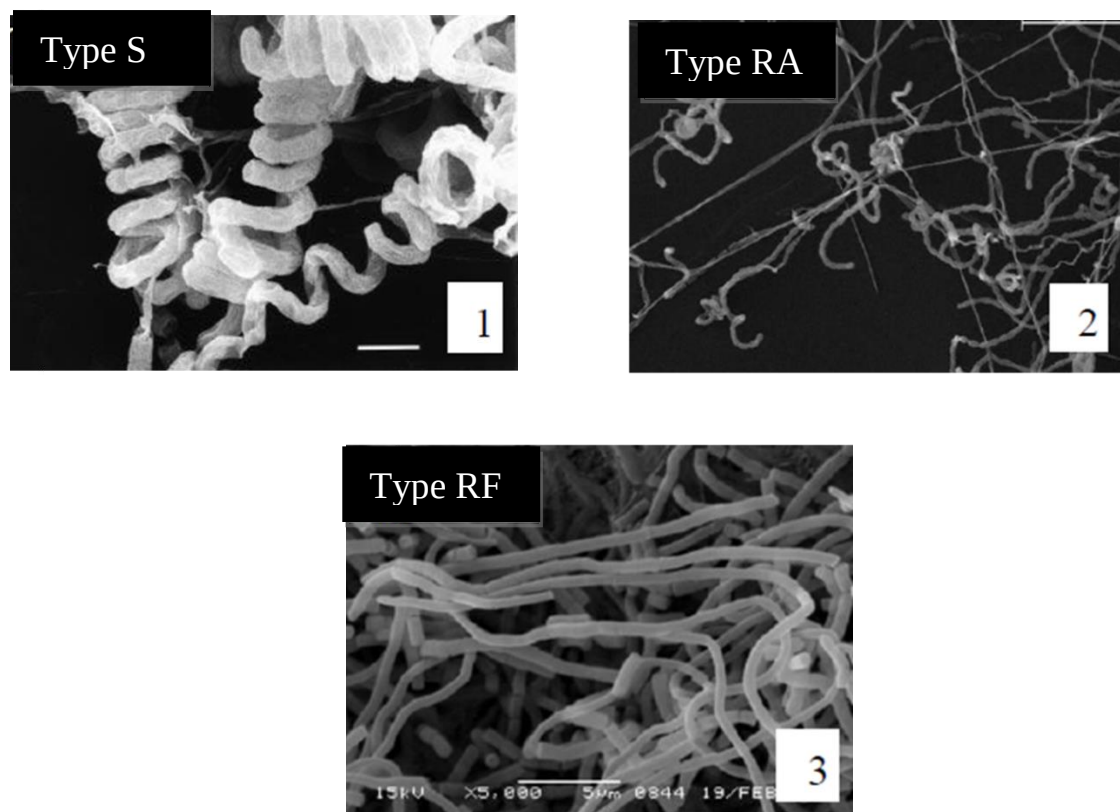


Figure 1. Types de chaînes de spores rencontrés chez les espèces de *Streptomyces* : (1) *Streptomyces avermectinius* selon Takahashi *et al.*, 2002 ; (2) *Streptomyces aomiensis* selon Nagai *et al.*, 2011 et (3) *Streptomyces xiamenensis* selon Xu *et al.*, 2009

RF, *Rectus Flexibilis* (chaînes de spores droites à flexueuses); **RA**, *Retinaculum Apertum* (chaînes en crochets ou en boucles fermées); **S**, *Spira* (chaînes spiralées).

2. Les *Streptomyces* dans le milieu marin

Plusieurs espèces de *Streptomyces* ont été isolées à partir du milieu marin ces dernières années ce qui montre la richesse de ce milieu en ce genre (tableau 2).

Tableau 2. Distribution de quelques souches de *Streptomyces* dans le milieu marin.

Espèces	Prévenance	Références
<i>Streptomyces chitinivorans</i>	Sédiments lacustres estuariens.	Ray <i>et al.</i> , 2016
<i>Streptomyces alkaliphilus</i>	Sédiments du lac Elmenteita dans la vallée du Rift au Kenya.	Akhwale <i>et al.</i> , 2015
<i>Streptomyces oceani</i>	Sédiment de la mer de Chine méridionale.	Tian <i>et al.</i> ., 2012
<i>Streptomyces glycovorans</i> <i>Streptomyces xishensis</i>	Sédiments des îles Xisha dans le sud de la Chine.	Xu <i>et al.</i> , 2011
<i>Streptomyces nanshensis</i>	Sédiment des îles Nansha de la mer de Chine méridionale.	Tian <i>et al.</i> ., 2009

V. Importance des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires bioactifs. En effet, ce genre est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (Sujatha *et al.*, 2005). La plupart des *Streptomyces* peuvent dégrader des composés d'origine animale ou végétale comme les polysaccharides (amidon, pectine, cellulose et chitine), des protéines (kératine et l'élastine), la lignocellulose et des autres composés aromatiques (Yikmis et Steinbuchel, 2012). Ils constituent une source inépuisable de substances antibactériennes, antifongique, antitumorales, antiparasitaires, (Hopwood, 2007), antivirales, insecticides, pesticides et herbicides, en plus des substances pharmacologiquement comme les immunomodulateurs (substances immunosuppressives et immunostimulantes), les substances vasoactives et les agents neurologiques (tableau 3).

Tableau 3. Quelques métabolites secondaires produits par les *Streptomyces* (Dyson, 2011 ; Solanki *et al.*, 2008).

Antibiotique	Espèces productrices	Type d'activité
Fosfomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	Antibacérien
Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>	
Chloramphenicol	<i>Streptomyces venezuelae</i>	
Clorobiocine	<i>Streptomyces coelicolor</i>	
Daunorubicine	<i>Streptomyces peucetius</i>	Antitumorale
Lavendamycine	<i>Streptomyces lavendulae</i>	
Bleomycine	<i>Sreptomyces verticillus</i>	
Bilaphos	<i>Streptomyces hygroscopicus</i>	Herbicide
Pimaricin	<i>Streptomyces natalensis</i>	Antifongique
Amphotericin B	<i>Streptomyces nodosus</i>	
Meilingmycine	<i>Streptomyces nanchangensis</i>	Antiparasitaire

VI. Les antibiotiques

1. Définition des antibiotiques

Un antibiotique (du grec *anti*, contre et *bios*, la vie) est une substance chimique naturelle, synthétique, ou semi synthétique ayant un mode d'action spécifique contre les bactéries. La majorité des antibiotiques sont des molécules naturelles, produites essentiellement par des bactéries ou certains champignons afin d'éliminer les micro-organismes sensibles (effet bactéricide) ou d'inhiber leur croissance (effet bactériostatique) (Kohanski *et al.*, 2010).

2. Mode d'action des antibiotiques

Le mode d'action d'un antibiotique est en relation avec sa structure chimique. En général, à chaque classe d'antibiotique est associé un site d'action dans la cellule microbienne. La plupart des antibiotiques ciblent les fonctions physiologiques ou leur structure moléculaire. Parmi les antibiotiques bactéricides, les β -lactamines (pénicilline, céphalosporine, carbapénames, monobactames) et les glycopéptides inhibent la synthèse de la paroi bactérienne. En particulier, les β -lactamines se lient à des enzymes appelées protéines de liaison des pénicillines (PLP) qui participent à la synthèse du peptidoglycane, le principal constituant de la paroi bactérienne. Il existe différentes PLP (PLP1, PLP2, etc.) n'ont pas la même affinité vis-à-vis des β -lactamines (Lewis *et al.*, 2012). Les glycopéptides tels que la vancomycine inhibent la synthèse de la paroi bactérienne en induisant un encombrement stérique qui bloque l'assemblage des précurseurs lors de la formation du peptidoglycane. Les quinolones sont des antibiotiques de synthèse qui empêchent quant à eux la réplication de l'ADN bactérien en inhibant l'ADN gyrase nécessaire à cette étape. Enfin, il existe d'autres mécanismes d'action des antibiotiques tels que le blocage de la synthèse protéique, plusieurs antibiotiques agissent au niveau du cycle des ribosomes et la biosynthèse des protéines des microorganismes (Lewis *et al.*, 2012). Parmi lesquels, les macrolides, les streptogramines et les lincosamides inhibent la synthèse protéique en se fixant sur la sous-unité 50S du ribosome en empêchant l'incorporation des aminosides. Par contre les tétracyclines et les aminosides (ex : streptomycine) se fixent sur la sous unité 30S en bloquant la traduction des protéines cellulaires et engendre plusieurs perturbations et des altérations fonctionnelles de la membrane cytoplasmique, ou l'inhibition de la production d'acide folique nécessaire à la synthèse des bases nucléiques (Sawada *et al.*, 1990 ; Ueki *et al.*, 1993).

VII. *Staphylococcus aureus*

Le *S. aureus* est l'agent pathogène le plus fréquemment rencontré en pathologie humaine et vétérinaire. Il est l'un des principaux responsables des infections nosocomiales et des intoxications alimentaires dont certaines sont grave et parfois mortelles (Sharif *et al.*, 2009). C'est l'espèce le plus fréquemment rencontrée à l'état naturel chez 15 à 30 % des individus sains au niveau des fosses nasales et de la gorge. Il est également présent (en plus faibles quantités) dans le tube digestif et au niveau du périnée (Prescott, 2010). Comme les autres Staphylocoques, il peut être saprophyte (sol, air, eau et aliments), commensal (peaux et muqueuses des mammifères) ou pathogène pour l'homme et les animaux (Caillon, 2008).

1. Les maladies causées par *S. aureus*

S. aureus parmi les autres pathogènes de l'homme, est celui qui est responsable de la plus grande variété de maladies qui touchent plusieurs parties du corps humain (tableau 4).

Tableau 4. Les maladies causées par *S. aureus* (Schaechter et Medoff, 1999).

Site d'infection	Maladies en cause
Infections de la peau et des tissus mous	Furoncles, abcès Infections des plaies (traumatiques, chirurgicales) Cellulite Impétigo (aussi causé par les Streptocoques)
Infection du système nerveux central	Abcès du cerveau Méningite-rare Abcès épidural
Infections pulmonaires	Embolie Aspiration
Muscles et squelette	Ostéomyélite Arthrite
Tractus génito-urinaire	Abcès rénal Infection du tractus urinaire inférieur
Maladies provoquées par des toxines	Syndrome du choc toxique Intoxications alimentaires (gastroentérites)

2. Antibiotiques antistaphylococciques

Des antistaphylococciques existent dans toutes les familles d'antibiotiques (hormis les polymyxines et les imidazoles). Les antistaphylococciques les plus utilisés appartiennent aux familles suivantes :

- Les β -lactamines : l'oxacilline du groupe des pénicillines M et la cloxacilline (ces derniers ont remplacé la méticilline) sont peu sensibles à l'action des pénicillinases acquises. Ces derniers restent les β -lactamines de référence pour le traitement des *S. aureus* en l'absence de résistance acquise.
- Les glycopeptides (vancomycine ou teicoplanine) en cas de résistance ou d'intolérance à cette première classe.
- Les aminosides (gentamicine), qui permettent d'obtenir une bactéricidie rapide en association à l'une des deux classes précédentes.

D'autres antibiotiques sont également utilisés : les fluoroquinolones, les streptogramines (pristinamycine), les macrolides, la clindamycine, le cotrimoxazole, la rifampicine, l'acide fusidique et la fosfomycine. Ces trois dernières molécules sont données en association du fait des fréquences élevées de mutations. Plus récemment, de nouveaux antibiotiques sont venus renforcer l'arsenal thérapeutique : une oxazolidinone, le linézolide, un lipopeptide, la daptomycine, une glycylicycline et la tigécycline (Comité de l'antibiogramme de la Société française de microbiologie, 2008).

3. L'émergence de la résistance de *S. aureus*

S. aureus a un fort pouvoir adaptatif et a développé différents mécanismes de résistance aux antistaphylococciques. Plus de 90 % des souches produisent une pénicillinase. L'oxacilline reste active contre ces souches, mais des staphylocoques hospitaliers, et plus récemment communautaires (présents hors de l'hôpital), ont développé une résistance croisée entre les pénicillines M (méticilline, oxacilline) et les autres β -lactamines par la production d'une protéine, la PLP2a, liant les pénicillines (PLP) et ayant une faible affinité pour ces composés. Le gène codant la PLP2a, *mecA*, est porté par un élément chromosomique (SCCmec- *Staphylococcal Cassette Chromosome mec*) qui contient également d'autres gènes de résistance aux métaux lourds et à d'autres antibiotiques, ceci expliquant le profil de multirésistance des *S. aureus* résistant à la méticilline (SARM) (Kuroda *et al.*, 2001).

Annexe 1

MILIEUX DE CULTURE

I. MILIEUX D'ISOLEMENT DES ACTINOBACTERIES

1. Milieu 1 (M1= Milieu "chitine - vitamines B agar ") (Hayakawa et Nonomura, 1987)

Chitine : 2 g ; K_2HPO_4 : 0,35 g ; KH_2PO_4 : 0,15 g ; $MgSO_4, 7H_2O$: 0,2 g ; NaCl : 0,3g ; $CaCO_3$: 0,02 g ; $FeSO_4, 7H_2O$: 10 mg ; $ZnSO_4, 7H_2O$: 1 mg ; $MnC_{12}, 4H_2O$: 1 mg ; agar: 18 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml. pH = 7,2.

Pour ce milieu, sont ajoutés:

* Les vitamines : Les vitamines : thiamine-HCl (B1), riboflavine (B2), niacine (B3), pyridoxine-HCl (B6), inositol (B7), panthoténate de calcium (B5) à raison de 0,5 mg/L et biotine (B8) à raison de 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées par filtration puis, dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.

* L'acide nalidixique à 10 mg L^{-1} , le cycloheximide (actidione) à 50 mg/L.

2. Milieu 2 (M2)

Chitine : 2 g ; sans les sels minéraux ; agar: 18 g; eau de mer: q.s.p. 1000 ml. pH = 7,2.

* Les vitamines: Les vitamines : thiamine-HCl (B1), riboflavine (B2), niacine (B3), pyridoxine-HCl (B6), inositol (B7), panthoténate de calcium (B5) à raison de 0,5 mg/L et biotine (B8) à raison de 0,25 mg/L. Les vitamines sont stérilisées par filtration puis, dissoutes en solution aqueuse stérile avant d'être ajoutées aseptiquement au milieu autoclavé.

* L'acide nalidixique à 10 mg L^{-1} , le cycloheximide (actidione) à 50 mg/L.

II. MILIEUX D'IDENTIFICATION DES ACTINOBACTERIES

1. Etude morphologique

1.1. Les milieux ISP ont été préconisés lors de l'« International *Streptomyces* Project » (Shirling et Gottlieb, 1966).

Annexe 1

1.1.1. Milieu ISP2

Glucose: 4 g; extrait de levure: 4 g; extrait de malt: 10 g; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH = 7,2.

1.1.2. Milieu ISP4

Amidon: 10 g; K_2HPO_4 : 1 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$: 1 g; $(NH_4)_2SO_4$: 2 g; $CaCO_3$: 2 g; solution saline standard* 1 ml; agar: 20 g; eau distillée: q.s.p. 1000 ml ; pH = 7,2.

*Solution saline standard : $FeSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g ; $MnCl_2 \cdot 4H_2O$: 0,1 g ; $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$: 0,1 g ; eau distillée : q.s.p .1000 ml.

III. MILIEU POUR L'EVALUATION DU PROFIL DE RESISTANCE ET L'ACTIVITE ANTAGONISTE

1. Milieu Mueller Hinton

Le milieu MH est prêt à l'emploi (IPA). Infusion de viande de bœuf : 300 ml ; peptone de caséine : 17,5 g ; amidon de maïs : 1,5 g ; agar : 17,0 g ; eau distillée: q.s.p. 1000 ml; pH = 7,4.

Annexe 2

Table de lecture. Valeurs critiques des diamètres des zones d'inhibition pour *Staphylococcus aureus*.

Antibiotiques testés	Charge des disques	Diamètre critique (mm)		
		R	I	S
Pénicilline	10 ul	≤28	-----	≥29
Oxacilline	-----	-----	-----	-----
Cefoxitine	30 µg	≤21	-----	≥22
Oxacilline	-----	-----	-----	-----
Cefoxitine	30 µg	≤24	-----	≥25
Gentamicine	10 µg	≤12	13-14	≥15
kanamicine	30 µg	≤13	14-17	≥18
amikacine	30 µg	≤14	15-16	≥17
Arythromycine	15 µg	≤13	14-22	≥23
clindamycine	2 µg	≤14	15-20	≥21
vancomycine		-----	-----	-----
vancomycine		-----	-----	-----
Teicoplanine	30 µg	≤10	11-13	≥14
Ofloxacin	5 µg	≤14	15-17	≥18
Ciprofloxacine	5 µg	≤15	16-20	≥21
Lévofloxacine	5 µg	≤15	16-20	≥21
Triméthoprim + sulfaméthoxazole	1.25/23.75µg	≤10	11-15	≥16
Rifampicine	5 µg	≤16	17-19	≥20
Tétracycline	30 µg	≤14	15-18	≥19
chloramphénicol	30 µg	≤12	13-17	≥18
Quinupristine-dalphopriline	15 µg	≤15	16-18	≥19
Acide fusidique**	10 µg	≤24	-----	≥24
Fosfomycine IV**		-----	-----	-----

*Tableau extrait du document M100 -S24. Vol. 34, n °1. 2014. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing ; twenty - forth informational supplément.

**Extraits des recommandations 2014 du comité de l'Antibiogramme de la société française de Microbiologie.

Annexe 3

Tableau. Liste des antibiotiques utilisés pour la détermination du profil de résistance des souches de *S. aureus* (Rahal *et al.*, 2014)

Famille d'antibiotique	Antibiotiques	Abréviation	Charge des disques
β-lactamines	Pénicilline G	PEN	10µg/ml
	Oxacilline	OXA	1 µg/ml
	Céfoxitine	FOX	30µg/ml
Aminosides	Amikacine	AN	30 µg/ml
	Gentamicine	GEN	10µg/ml
	Kanamycine	KAN	30µg/ml
Macrolides	Erythromycine	ERY	15µg/ml
	Pristinamycine	PR	15µg/ml
Quinolones	Ofloxacine	OFX	5µg/m
	Lévofoxacine	LVX	5µg/m
	Ciprofloxacine	CIP	5µg/ml
Phénicoles	Chloramphénicol	CHL	30µg/ml
Glycopéptides	Vancomycine	VAN	30 µg/ml
	Teicoplanine	TEC	30 µg/ml
Rifamycines	Rifampicine	RIF	5µg/ml
Sulfamides	Triméthoprim+ Sulfaméthoxazole	SXT	1,25/23,75µg/ml
	Tétracycline	TCY	30µg/ml
Fusidanines	Acide Fusidique	FUS	10µg/ml
Acide phosphonique	Fosfomycine	FOS	4 µg/ml

Glossaire

Furoncle	Le furoncle est une infection bactérienne profonde d'un follicule pileux provoquant la nécrose périfolliculaire et la suppuration. Il en résulte une induration douloureuse du derme causée par une accumulation de pus et de tissus morts.
Abcès	Un abcès est une accumulation locale de pus après nécrose dans une cavité néoformée.
Infections des plaies	Ce sont des infections de site chirurgical caractérisé par la présence de pus, des signes inflammatoires locaux et la documentation de micro-organismes.
Cellulite	La cellulite ou lipodystrophie superficielle correspond à un aspect de peau d'orange de manière spontanée ou à la suite du pincement de la peau. Elle est le résultat d'une variante de la normale de répartition du tissu adipeux (lipodystrophie), augmenté au niveau de la peau de certaines régions caractéristiques chez la femme.
Impétigo	L'impétigo est une infection cutanée superficielle bactérienne, due à un streptocoque (<i>Streptococcus pyogenes</i>) et/ou à un staphylocoque (<i>Staphylococcus aureus</i>).
Abcès du cerveau	C'est une poche de pus localisée dans le cerveau. Les causes sont nombreuses pour une affection qui reste rare et qui touche tous les âges.
Méningite rare	La méningite est une inflammation des méninges : les enveloppes de la moelle épinière et du cerveau dans lesquelles circule le liquide céphalorachidien.
Aspiration	L'aspiration est une affection pulmonaire causée par l'inhalation de liquides ou d'autres agents irritants dans les poumons provenant de l'estomac après des vomissements.
Ostéomyélite	L'ostéomyélite hématogène est une infection osseuse due à un germe qui atteint l'os par voie hématogène. Elle siège préférentiellement au niveau des métaphyses des os longs.

Arthrite	L'arthrite correspond à un ensemble de phénomènes inflammatoires qui affectent l'articulation et les os, et qui s'accompagnent de douleurs plus ou moins sévères.
Abcès rénal	C'est une infection majeure du rein avec collection de pus.
Infection du tractus urinaire inférieur	Ce sont des infections rencontrées beaucoup plus chez les femmes que chez les hommes. Les infections du tractus urinaire portent un nom différent selon la partie concernée.
Syndrome du choc-toxique	Est une maladie infectieuse rare et aiguë, potentiellement létale, causée par une toxine bactérienne qui pénètre dans la circulation sanguine à la suite d'une infection par un agent pathogène.
Gastroentérites	Est une infection inflammatoire du système digestif pouvant entraîner des nausées, des vomissements, des crampes abdominales, diarrhée, ainsi que de la déshydratation, la fièvre et des céphalées (maux de tête).