

République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



Université de BLIDA 1



Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

Département de Biologie et Physiologie Cellulaire

## MEMOIRE DE FIN D'ETUDE

En vue de l'obtention du diplôme de Master

Domaine: Science de la Nature et de la vie

Filière: Sciences biologiques

Spécialité: Microbiologie – Bactériologie

Thème:

**Etude des propriétés antagonistes de quelques souches de *Streptosporangium* sp contre des bactéries et des champignons pathogènes.**

Présenté par :

**LADJALI FARIDA**

Soutenue le 29/10/2015

Devant le jury composé de :

Mme. AIT SAADI N.	M.A.A	Université de BLIDA	Présidente
Mme. BOKRETA S.	M.C.B	Université de BLIDA	Examinatrice
Mme. MEKLAT A.	M.C.A	Université de BLIDA	Promotrice

Année universitaire :2014/2015

# Remerciements

*Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de L'École Normale Supérieure (ENS) de Kouba, Sous la direction du professeur SABAOU Nasserdineen . Ses qualités scientifiques sont pour nous, un exemple dans le domaine de la recherche toute ma remerciement pour m'avoir initié à la recherche et pour ses précieux conseils, son aide et sa disponibilité.*

*Le travail présenté a été dirigé par Docteur MEKLAT Atika Maître de Conférence a l'Université Saâd Dahleb de Blida. Je tiens à lui exprimer ma profonde gratitude pour m'avoir encadré pendant la durée de ce mémoire, pour la confiance qu'elle m'a accordée, pour ses remarques pertinentes et pour m'avoir guidé et conseillé.*

*Un remerciement spécial à Mademoiselle CHAABANE CHAOUCH Fouzia, (ENS de Kouba) pour ses encouragements, pour réaliser ce travail.*

*Je voudrais également remercier Madame AITSAADI Nacéra, Maître Assistante à l'Université Saâd Dahleb de Blida, pour avoir accepté de présider le jury.*

*Mes sincères remerciements s'adressent également à Madame BOKRETA S. Maitre de Conférence à l'Université Saâd Dahleb de Blida, pour avoir accepté d'examiner ce travail.*

*Etant donné qu'un travail de recherche ne se fait jamais seul, Je voudrais également remercier chaleureusement l'ensemble des membres du SBSM de l'ENS de Kouba, en particulier Monsieur MOKRANE ,Monsieur LAHOUME ,Madame BOUDJELLA , Madame KASSI ; Mademoiselle Allam soumia et Mademoiselle Boukerrit fatima .*

*Je souhaiterais également remercier mes enseignants, du cycle primaire jusqu'au cycle universitaire.*

## RESUME

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence les activités antimicrobiennes de quelques souches d'actinobactéries provenant de différents sols Sahariens d'Algérie (Adrar, Béchar et Hoggar) et appartenant au genre *Streptosporangium*.

Au total, 7 souches appartenant au genre *Streptosporangium* ont été isolées sur le milieu Chitine –vitamines-B agar (Ch-VB) en utilisant des agents antimicrobiens, ces souches ont fait l'objet d'une étude préliminaire de leurs propriétés antagonistes.

La souche Sg20 de *Streptosporangium* a montré une forte activité qui s'étend sur les champignons filamenteux, les levures et les bactéries à Gram positif. Cette souche a été choisie pour la suite de l'étude des activités antimicrobiennes, sur milieu liquides. Les résultats ont montré que le milieu Bennett est le meilleur pour la production des substances antimicrobiennes par la souche Sg20.

Une cinétique de croissance et de production des molécules antimicrobiennes a permis de déterminer le jour optimal de production qui est le 6<sup>ème</sup> jour.

L'antibiographie a montré que l'Acétate d'éthyle est le meilleur solvant d'extraction des activités antimicrobiennes produites par la souche Sg20.

La purification des extraits obtenus par HPLC a montré la présence de sept molécules bioactives.

**Mots clés:** bactéries pathogènes, *Streptosporangium*, champignons pathogènes, propriétés antagonistes,

## ABSTRACT

The aim of this study is to evaluate the antibacterial activity of some isolated antimicrobial strains from different Saharan soils of Algeria (Adrar, Béchar, and Hoggar) belonging to the genus *Streptosporangium*.

A total of 7 strains belonging to the genus *Streptosporangium* were isolated by using the selective medium chitin vitamins agar (Ch-V), and subjected to a preliminary study for their antagonistic properties.

The strain *Streptosporangium* sp. Sg20 exhibited a strong activity against fungi, yeast and Gram positive bacteria. This strain was chosen for further study of antimicrobial activities. The liquid medium Bennett showed better results in regards to the production antimicrobial substances when compared with ISP2 from Sg20.

The kinetics of growth and production of antimicrobial compounds have allowed determining the day of optimum production it's the 6<sup>th</sup> day.

The antibiography showed that the best solvent for extraction of antimicrobial activities was Acétate d'éthyle for strain Sg20.

The extracts were analyzed by HPLC, data analysis of the obtained chromatographic profiles allowed us to predict the presence of at least 7 different antibacterial substances which were produced by the selected strain Sg20.

**Key words:** bacteria , *Streptosporangium* , fungi, antagonistic properties,



## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط ضد البكتيري لبعض السلالات من الأكتينوبكتيريا المعزولة من أترية من مناطق صحراوية مختلفة في الجزائر (أدرار، بشار والهقار) والمنتمية للجنس *Streptosporangium*.

تم عزل 7 سلالات للجنس *Streptosporangium* باستعمال الوسط Chitine-vitamine-B agar مدعم بعوامل العزل الانتقائي كانت هذه السلالات محل دراسة اولية لتقدير خصائصها التضادية.

اضهرت السلالة المسماة Sg20 و المنتمية للجنس *Streptosporangium* نشاط ضد مكروبي قوي تجاه الفطريات, الخمائر و البكتيريا موجبة الغرام.و لذلك اختيرت هذه السلالة لمواصلة الدراسة الخاصة بالجزينات ذات النشاط الميكروبي.

اضهرت الدراسات المتعلقة بإنتاج المركبات المضادة للبكتيريا تفوق الوسط Bennett على الوسط ISP2 .

سمحت دراسة حركية النمو و انتاج الجزينات ذات النشاط ضد الميكروبي بتحديد اليوم الموافق للإنتاج الأمثل الاعظمي لهذه الجزينات- اليوم 6-. تبين من خلال الكشف التضادي Antibiographie أن المذيب العضوي الأفضل لاستخلاص الجزينات الفعالة هو خلات الاثيل Acétate d'éthyle بالنسبة للسلالة Sg20 .

. اوضحت نتائج التنقية بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء -HPLC- للمستخلصات المحصل عليها مالا يقل عن سبعة مركبات ذات نشاط بكتيري و التي يتم افرازها من قبل السلالة قيد الدراسة Sg20

كلمات مفتاحية الاكتينوبكتيريا. *Streptosporangium* , الفطريات , نشاط ضد البكتيري , الكشف التضادي, مركبات ذات نشاط ضد البكتيري , الكشف التضادي, أترية صحراوية.



## ملخص

تهدف هذه الدراسة إلى تقدير النشاط ضد البكتيري لبعض السلالات من الأكتينوبكتيريا المعزولة من أترية من مناطق صحراوية مختلفة في الجزائر (أدرار، بشار والهقار) والمنتمية للجنس *Streptosporangium*.

تم عزل 7 سلالات للجنس *Streptosporangium* باستعمال الوسط Chitine-vitamine-B agar مدعم بعوامل العزل الانتقائي كانت هذه السلالات محل دراسة اولية لتقدير خصائصها التضادية.

اظهرت السلالة المسماة Sg20 و المنتمية للجنس *Streptosporangium* نشاط ضد مكروبي قوي تجاه الفطريات, الخمائر و البكتيريا موجبة الغرام.و لذلك اختيرت هذه السلالة لمواصلة الدراسة الخاصة بالجزينات ذات النشاط الميكروبي.

اظهرت الدراسات المتعلقة بإنتاج المركبات المضادة للبكتيريا تفوق الوسط Bennet على الوسط ISP2 .

سمحت دراسة حركية النمو و انتاج الجزينات ذات النشاط ضد الميكروبي بتحديد اليوم الموافق للإنتاج الأمثل الاعظمي لهذه الجزينات- اليوم 6-. تبين من خلال الكشف التضادي Antibiographie أن المذيب العضوي الأفضل لاستخلاص الجزينات الفعالة هو خلات الاثيل Acétate d'éthyle بالنسبة للسلالة Sg20 .

. اوضحت نتائج التنقية بتقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء -HPLC- للمستخلصات المحصل عليها ما لا يقل عن سبعة مركبات ذات نشاط بكتيري و التي يتم افرازها من قبل السلالة قيد الدراسة Sg20

**الكلمات المفتاحية :** بكتيريا مضرّة, *Streptosporangium*, الفطريات ضارة, نشاط ضد البكتيري.



# INDEX DES FIGURES

	page
<b>Figure 1.</b> Micromorphologie de quelques espèces appartenant au genre <i>Streptosporangium</i> , vue au microscope électronique à balayage .	7
<b>Figure 2.</b> La méthode des cylindres d'agar.	15
<b>Figure 3.</b> Activité antifongique (A) et antibactérienne (B) par la méthode des cylindres d'agar de quelques souches de <i>Streptosporangium</i> .	20
<b>Figure 4 .</b> Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique de la souche sg20 par la méthode des puits contre les souches SARM (MRSA 639c, <i>S. aureus</i> ATCC 29213 et <i>S. aureus</i> ATCC 43300) et BS ; UR; du jour 1 au jour 10.	24
<b>Figure 5.</b> Cinétiques de l'activité antibactérienne, de la souche Sg20 dans le milieu Bennett, contre (MRSA 639c, <i>S. aureus</i> ATCC 43300 et <i>S. aureus</i> ATCC 29213) et BS.	25
<b>Figure 6.</b> Profils chromatographiques des extraits organiques du filtrat de culture de la souche Sg20 solubilisé dans du méthanol (colonne waters C18, gradient méthanol-eau, débit: 1 mL/min; détection: 220 nm).	27

# LISTE DES ABRÉVIATIONS

AC : *Aspergillus carbonarius*

AND: Acide désoxyribonucléique

ARNr: Acide ribonucléique ribosomique

ATCC: American Type Culture Collection

Bs : *Bacillus subtilis*

~~BORSA~~: Borderline Resistant *Staphylococcus aureus*

Ch.VB: Chitine-vitamines B-agar

DAP: ~~Acide diaminopimélique~~ Diaminopimelic acid

FC : *Fusarium culmorum*

G+C%: pourcentage en Guanine + Cytosine

~~GISA~~: Glycopeptide Intermediate Sensitive *Staphylococcus aureus*

GN: Gélose nutritive

h: Heure

HPLC: High Performance Liquid Chromatography

~~HTA~~: Milieu Hickey-Tresner-Agar

~~ISP~~: International *Streptomyces* Project ISP2 : International *Streptomyces* Project 2

LBSM: Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens

M3 : *Candida albicans*

MA: Mycélium aérien

MeOH: Méthanol

MecA: Methicillin resistant gene

MK: Ménaquinones

mL: millilitre

mm: millimètre

~~MODSA~~: Modified Penicillin-Binding Protein

MS: Mycélium de substrat

P.: *Planomonospora*

PCR: Polymerase Chain Reaction

PL: Phospholipides

~~PGPR~~: Plant Growth Promoting Rhizobacteria

PLP: protéine liant la pénicilline

Rpmrpm: rotations par ~~per~~ minute

S. aureus: *Staphylococcus aureus*

Mis en forme : Police :22 pt, Police de script complexe :22 pt

Mis en forme : Gauche

Mis en forme : Police :Gras, Police de script complexe :Gras

Mis en forme : Police :Gras, Non Italique, Police de script complexe :Gras, Non Italique

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Police :12 pt, Police de script complexe :12 pt

Mis en forme : Police :Gras, Police de script complexe :Gras

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 6 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Espace Après : 6 pt, Interligne : simple

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Interligne : simple, Taquets de tabulation : 2,75 cm, Gauche

Mis en forme : Police :Gras, Police de script complexe :Gras

Mis en forme : Police :Non Gras, Police de script complexe :Non Gras

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Police :Gras, Police de script complexe :Gras

Mis en forme : Espace Après : 0 pt, Ne pas ajuster l'espace entre le texte latin et asiatique, Ne pas ajuster l'espace entre le texte et les nombres asiatiques

Mis en forme : Police : (Par défaut) Times New Roman, Police de script complexe : Times New Roman

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Police :Italique, Police de script complexe :Italique

Mis en forme : Interligne : simple

Mis en forme : Interligne : simple

**SARM:** *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

**SASM:** *Staphylococcus aureus* sensible à la méthicilline **Sg** : *Streptosporangium*,

**UR** : *Umbelopsis ramanniana*,

**SCCmec:** *Staphylococcal cassette chromosome mec* Cassettes chromosomiques staphylococciques *mec*

**µL:** microlitre

**µm:** micromètre

**°C:** Degré Celsius

**Mis en forme :** Police : 14 pt, Police de script complexe : 14 pt

**Mis en forme :** Police : (Par défaut) + Titres CS, 12 pt, Non Gras, Police de script complexe : + Titres CS, 12 pt, Non Gras

**Mis en forme :** Police : Gras, Non Italique, Police de script complexe : Gras, Non Italique

**Mis en forme :** Espace Après : 0 pt, Interligne : 1,5 ligne, Ne pas ajuster l'espace entre le texte latin et asiatique, Ne pas ajuster l'espace entre le texte et les nombres asiatiques

**Mis en forme :** Police : (Par défaut) Times New Roman, Police de script complexe : Times New Roman

**Mis en forme :** Interligne : simple

**Mis en forme :** Gauche, Espace Après : 8 pt, Interligne : simple

**Mis en forme :** Police : (Par défaut) + Titres CS, Police de script complexe : + Titres CS

**Mis en forme :** Interligne : simple



## Introduction

---

L'émergence des bactéries multi-résistantes aux médicaments et le manque de nouveaux antibiotiques avec de nouveaux modes d'action représente aujourd'hui l'un des problèmes majeurs pour traiter les maladies infectieuses qui sont l'une des principales causes de décès dans le monde (Livermore, 2009). Le problème n'est pas seulement du point de vue de santé, mais il a aussi un impact significatif sur la politique et l'économie de tous les pays. En effet, par exemple, le coût annuel de la résistance antimicrobienne dans les hôpitaux est estimé à 4,5 milliards de dollars .

Les actinobactéries, sont des bactéries à Gram positif, dont la plupart sont mycéliens, représentent l'une des plus importantes sources d'antibiotiques, soit 45% des molécules bioactives d'origine microbienne (Solecka *et al.*, 2012). Elles sont particulièrement très intéressantes pour leur très grande faculté à produire différents composés à intérêt pharmaceutique tels que les composés antibactériens, antifongiques, antiviraux, antiparasitaires et antitumoraux, ainsi que les vitamines, les enzymes, les immunostimulants , les vasodilatateurs, etc (Valan Arasu *et al.*, 2008; Jose et Jebakumar, 2013).

En Algérie, les sols sahariens qui représentent un écosystème particulier, se sont révélés être riches en actinobactéries (Sabaou *et al.*, 1980; Sabaou *et al.*, 1992 et 1998), Certaines d'entre elles appartiennent aux genres rares à peu fréquents tels que *Actinomadura*, *Nonomuraea*, *Nocardopsis*, *Saccharothrix*, *Spirillospora*, *Streptosporangium*, *Actinopolyspora*, etc. (Hacène *et al.*, 1998; Zitouni *et al.*, 2005; Badji *et al.*, 2005 et 2007; Meklat *et al.*, 2011; Aouiche *et al.*, 2012; Boubetra *et al.*, 2013b,c; Meklat *et al.*, 2013). Certaines de ces souches produisent de nouvelles molécules antimicrobiennes. À titre d'exemple, une souche de *Streptosporangium* sp. (notée Sg3) synthétise une nouvelle molécule bioactive qui s'est révélée être une angucyclinone (Boudjella *et al.*, 2010).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés au genre *Streptosporangium* relativement rare dans le monde. Depuis sa découverte, avec l'espèce type *Streptosporangium roseum* (Couch, 1955) . Ce genre a été également isolé des sols des environnements extrêmes comme ceux du Sahara algérien (Boudjella ;1994; Bouti 1997; Sabaou et al.1998). Pour notre part, nous nous sommes fixés comme objectif d'évaluer les propriétés antagonistes des souches du genre *Streptosporangium* contre des microorganismes pathogènes pour l'homme, et de sélectionner la meilleure souche pour l'étude des activités antimicrobienne en milieu liquide et de purifier les antibiotiques sécrétés par ce dernière.

# Introduction

---

Ce travail est réparti en trois parties:

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

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

# Partie I: Etude bibliographique

---

## I. TAXONOMIE DES ACTINOBACTÉRIES

### 1. Définition et taxonomie générale des actinobactéries

le terme utilisé précédemment pour désigner les actinobactéries est "actinomycètes". Ce mot est dérivé des mots grecs "Aktis" qui veut dire rayon et "Mykes" qui veut dire champignon, c'est-à-dire, "champignons rayonnants" (Gottlieb, 1973). C'est en 1877 que Bollinger a utilisé pour la première fois le terme "actinomycète" pour désigner l'agent étiologique d'une actinomycose du bétail (Apotheloz et Regamey, 1996). Les premières études de ces microorganismes ont conduit à les considérer comme étant des formes intermédiaires entre les bactéries et les champignons. Les actinobactéries sont depuis longtemps classées parmi les procaryotes et définies selon l'édition 2012 du Manuel de Bergey comme regroupant les bactéries à Gram positif ayant un pourcentage de guaninecytosine supérieur à 55%, le plus souvent compris entre 60 et 75% (Chun et al., 1997). Avant 2012, le phylum *Actinobacteria* comprenait une seule classe (*Actinobacteria*) et un seul ordre (*Actinomycetales*) (Manuel de Bergey, 2004). Actuellement, le phylum des actinobactéries comprend 5 classes, 21 ordres, 50 familles et 221 genres par une diversité morphologique importante: du simple bacille diphthéroïde (ex: *Corynebacterium*) à des formes mycéliennes qui peuvent être fragmentées ou non.

### 2. Caractéristiques générales

Les actinobactéries sont des microorganismes procaryotes. La plupart sont aérobies et à développement mycélien significatif, et parmi lesquels se trouve la majorité des espèces utiles, bien qu'il en existe d'autres formes anaérobies ou sans mycélium évident, et généralement pathogènes (Goodfellow et Williams, 1983). En général les actinobactéries sont saprophytes, hétérotrophes et mésophiles (Zitouni, 2005).

les actinobactéries mycéliennes produisent un mycélium aérien (de nombreux genres) ou non (ex : *Rhodococcus* et *Micromonospora*) et un mycélium du substrat à l'exception du genre *Sporichthya* dont le mycélium aérien est rattaché directement au substrat solide par des cellules "crampons" (Boudjella, 2007). Généralement, le mycélium aérien est plus épais et moins ramifié que le mycélium du substrat (Silvey et Roach, 1975). Les filaments peuvent produire des spores soit isolées, soit groupées par deux ou en chaînes ou même contenues dans des vésicules appelées sporanges. Certains genres produisent des spores mobiles, tels que *Dactylosporangium*, *Planomonospora* et *Actinoplanes* (Ensign et al., 1993) et d'autres des structures spéciales telles que les synnemata (*Actinosynnema*), les faux sporanges (*Kibdellosporangium*), etc.

## Partie I: Etude bibliographique

---

### 3. Identification des actinobactéries

L'identification des actinobactéries repose actuellement sur l'ensemble des critères **morphologiques** (La couleur du mycélium aérien (MA) et/ou du mycélium du substrat (MS), La production ou non des pigments diffusibles dans le milieu de culture aérien (MA), La fragmentation ou non du MS, La présence de spores, leur forme, leur mobilité, leur disposition sur les hyphes, leur surface et leur nombre). **chimiques** (Chez les actinobactéries, la chimiotaxonomie consiste à déterminer la composition en acides aminés et en acides mycoliques pariétaux, en sucres dans les cellules entières, et en phospholipides, ménaquinones et acides gras membranaires), **physiologiques** (la dégradation ou non de plusieurs composés organiques, la sensibilité ou non aux agents physiques et chimiques ) et **moléculaires** (à la détermination du pourcentage en GC, le séquençage du gène codant pour l'ARN ribosomique 16S et à l'hybridation ADN-ADN.).



# Partie I: Etude bibliographique

---

## II. Taxonomie des *Streptosporangiaceae* à sporanges

### 1. La famille des *Streptosporangiaceae*

La famille des *Streptosporangiaceae* a été créée par [Goodfellow \*et al.\* \(1990\)](#) sur la base d'une analyse des séquences de l'ADNr 16S. Elle est représentée par le genre type *Streptosporangium* ([Couch, 1955](#)) et est caractérisée par la présence dans les cellules du DL-DAP, du madurose, des phospholipides de type PIV et par l'absence d'acides mycoliques. Cette famille inclut les microorganismes aérobies, à Gram positif, formant un mycélium de substrat non fragmenté. Le mycélium aérien peut produire deux (*Microbispora*), quatre (*Microtetraspora*) ou plusieurs spores (*Nonomuraea*) ou encore des sporanges contenant une (*Planomonospora*), deux (*Planobispora*), quatre (*Planotetraspora*) ou plusieurs spores (*Streptosporangium*). La famille des *Streptosporangiaceae* est proche phylogénétiquement des *Streptomycetaceae*, des *Nocardiopsaceae* et des *Thermomosporeaceae*. Grâce à l'analyse de l'ADNr 16S, [Stackebrandt \*et al.\* \(1997\)](#) ont classé cette famille dans le sous-ordre des *Streptosporangiales*, l'ordre des *Actinomycetales* et la classe des *Actinobacteria*.

Dans ce travail, nous nous limiterons à l'étude des *Streptosporangiaceae* à sporanges englobant les genres *Streptosporangium*.

### 2. Le genre *Streptosporangium*

Le genre *Streptosporangium* est le genre-type de la famille des *Streptosporangiaceae* ([Goodfellow \*et al.\*, 1990](#)) et de l'ordre des *Streptosporangiales* ([Goodfellow 2012](#)). Ce genre a été créé par [Couch \(1955\)](#) avec comme espèce-type *S. roseum*. Par la suite, la description de ce genre a été amendée par [Stackebrandt \*et al.\* \(1994\)](#).

Micromorphologiquement, ce genre est caractérisé par un mycélium du substrat stérile et non fragmenté, à l'exception de celui de *S. sandarakinum* GW-12028T qui se fragmente facilement en cellules en forme de bâtonnets irréguliers sur le milieu 65(DSMZ, <http://www.dsmz.de/microorganisms/medium/>) ([Kampfer \*et al.\*, 2013](#)). Le mycélium aérien chez les *Streptosporangium*, produit des sporanges globuleux, sessiles ou portés par de courts sporangiophores, contenant chacun une seule chaîne spiralée non ramifiée de spores non mobiles, rondes à ovoïdes ou plus rarement en forme de bâtonnets droits.([figure1](#))

Très récemment, [Intra \*et al.\* \(2014\)](#) ont isolé une nouvelle espèce de *Streptosporangium*, *S. jomthongense*, qui produit des spores globuleuses isolées sur le mycélium aérien, sans production de sporanges. Du point de vue chimiotaxonomique, le genre *Streptosporangium*

## Partie I: Etude bibliographique

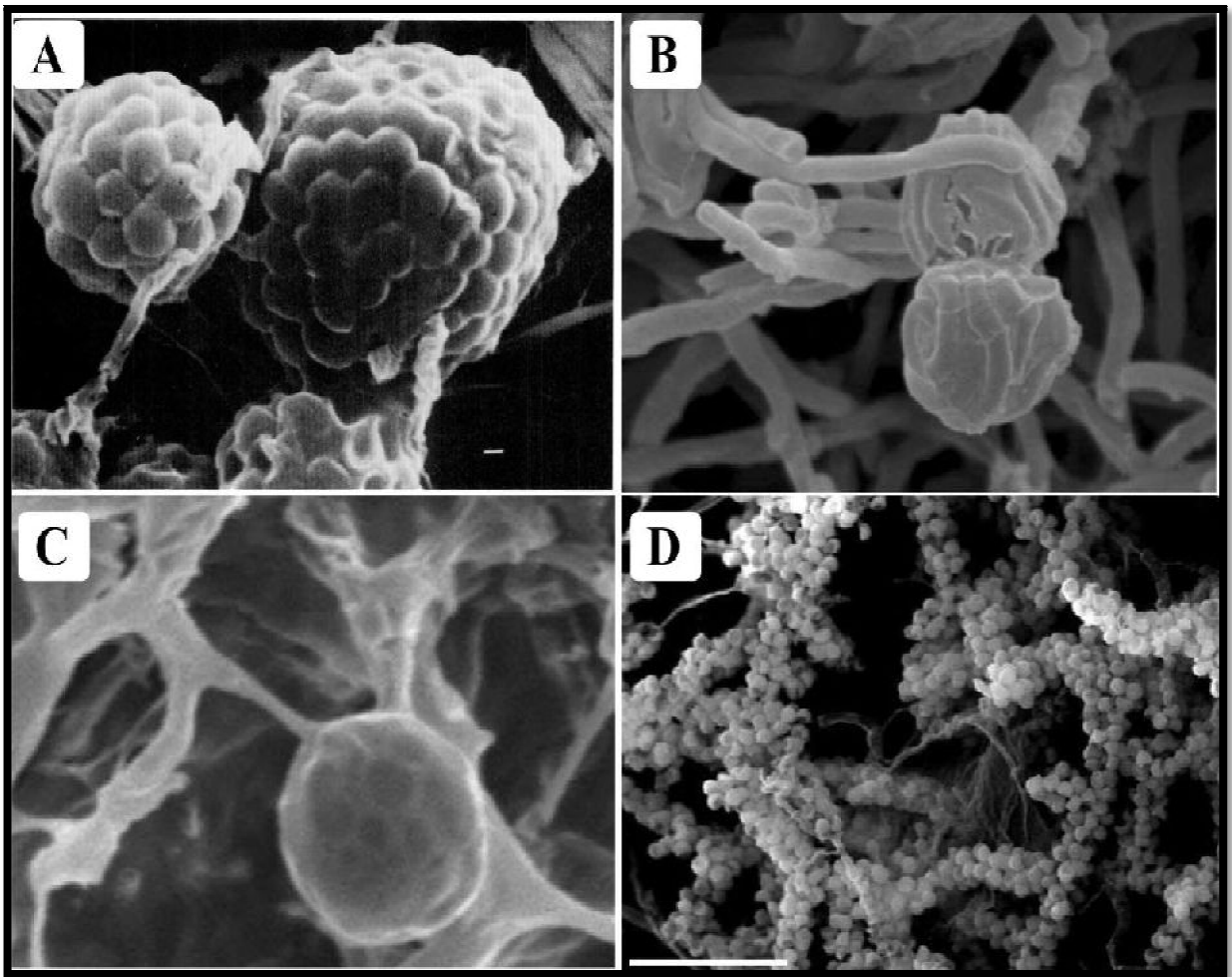
---

est caractérisé par une paroi cellulaire de type III B, c'est-à-dire, présence de l'isomère DL (*méso*) de l'acide diaminopimélique et absence de glycine, et présence du sucre caractéristique qui est le madurose (3-*O*-méthyle-D-galactose) [Stackebrandt et al. \(1994\)](#). Les phospholipides membranaires sont du type PIV. Les ménaquinones prédominants sont de type MK-9(H2) et MK-9(H4). Les acides mycoliques sont absents.

Génétiquement, les membres de *Streptosporangium* ont un pourcentage en bases G+C variant entre 66,2 et 71 % ([Quintana and Goodfellow, 2012](#); [He et al., 2014](#); [Zhang et al., 2014](#)). En se basant sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S, Les espèces les plus différentes entre elles, *S. violaceochromogenes* et *S. yunnanense*, partagent un taux de similarité de 95,2 %, contrairement aux souches-types de *S. album*, *S. roseum* et *S. vulgare* qui ont des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S, identiques entre elles ([Manuel du Bergey, 2012](#)). Du point de vue physiologique, peu d'informations sont fournies sur le métabolisme des souches du genre *Streptosporangium* ([Manuel du Bergey, 2012](#)). En général, les *Streptosporangium* utilisent une large gamme de composés comme sources de carbone ([Whitham et al., 1993](#); [Zhang et al., 2002, 2005](#)).

### 2.1. Espèces appartenant au genre *Streptosporangium*

Bien que les espèces de ce genre peuvent être différenciées entre elles par quelques caractéristiques morphologiques (couleur des mycélia aérien et du substrat, taille et forme des spores, longueur du sporangiospore, etc.) et physiologiques, l'étude génétique reste un critère très important tel que le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S.



**Figure 1.** Micromorphologie de quelques espèces appartenant au genre *Streptosporangium*, vue au microscope électronique à balayage.

A. *S. carneum* DSM 44125<sub>T</sub> (Mertz et Yao, 1990).

B. *S. anatoliense* N9999<sub>T</sub> (Sazak *et al.*, 2012).

C. *S. shengliense* NEAU-GH7<sub>T</sub> (Zhang *et al.*, 2014).

D. *S. jomthongense* 30EHS<sub>T</sub> (Intra *et al.*, 2014).

## Partie I: Etude bibliographique

**Tableau1.**Liste des espèces du genre *Streptosporangium*.(in chaabane Chaouch 2014)

Espèces	Numéros d'accès dans les collections mondiales de microorganismes
<i>S. roseum</i>	DSM 43021T/CP001814
<i>S. amethystogenes</i> subsp.	DSM 43179T/X89935
<i>S. album</i>	DSM 43023T/X89934
<i>S. vulgare</i>	DSM 43802T/X89955
<i>S. longisporum</i>	DSM 43180T/X89944
<i>S. nondiasticum</i>	IFO 13990T/U48994
<i>S. pseudovulgare</i>	DSM 43181T/X89946
<i>S. violaceochromogenes</i>	DSM 43849T/X89951
<i>S. fragile</i>	DSM 43847T/X89942
<i>S. carneum</i>	DSM 44125T/X89938
<i>S. subroseum</i>	CY-7113T/AF191734
<i>S. purpuratum</i>	CY-15110T/AF191735
<i>S. yunnanense</i>	CY-11007T/AF191733
<i>S. canum</i>	HBUM 170018T/AY996844
<i>S. oxazolinicum</i>	K07-0460T/AB594818
<i>S. anatoliense</i>	N9999T/HQ157194
<i>S. sandarakinum</i>	GW-12028T/JX977118
<i>S. shengliense</i>	NEAU-GH7T/KC513503
<i>S. jomthongense</i>	30EHS T/JQ922513
<i>S. nanhuense</i>	NEAU-NH11T/KF146932

### III. ÉCOLOGIE DES ACTINOBACTÉRIES

#### 1. Distribution dans l'environnement

Les actinobactéries sont des microorganismes ubiquitaires. Elles colonisent une grande variété d'habitats naturels (Tableau2). En effet, elles sont isolées à partir des déserts chauds, des eaux et des sédiments des lacs riches en soude, des sites pollués par des hydrocarbures et des métaux lourds, des sédiments marins profonds, etc., avec toutefois une préférence pour les sols (Goodfellow et Williams, 1983; Khamna *et al.*, 2009). Cette propriété provient de leur grande capacité à s'adapter aux différentes conditions et à se développer sur une large gamme de substrats grâce à leur système enzymatique puissant, et aussi par la facilité et la grande portée de la dissémination de leurs spores (via l'air, les eaux, les insectes, etc.) (Ruddick et Williams, 1971).

# Partie I: Etude bibliographique

Tableau2. Distribution de certains genres d'actinobactéries dans la nature (Manuel de Bergey, 2012).

Genre	Habitat
<i>Amycolatopsis</i>	Sol.
<i>Actinoplanes</i>	Eau, sol.
<i>Aeromicrobium</i>	Sol, plantes, air, habitats aquatiques.
<i>Brevibacterium</i>	Produits laitiers, peau, matériels cliniques.
<i>Micromonospora</i>	Eau, sol.
<i>Rhodococcus</i>	Sol, eaux douces, sédiments marins.
<i>Saccharomonospora</i>	Matière en décomposition.
<i>Salinispora</i>	Eaux marines tropicales et subtropicales.
<i>Streptomonospora</i>	Sols hypersalins.
<i>Streptomyces</i>	Sol, eau, litière

## 2. Distribution dans les sols sahariens algériens

Les habitats extrêmes sont des sources attrayantes des actinobactéries en général, et de différentes espèces de *Streptomyces*, *Micromonospora*, *Nocardia*, *Nocardiopsis*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Actinoplanes*, *Amycolatopsis*, *Saccharopolyspora*, *Streptosporangium*, etc. (Genilloud *et al.*, 2011). Dans ce contexte, les sols sahariens algériens représentent un milieu extrême favorable au développement des formes adaptées à ces conditions. L'exploration de ces sols a été entreprise par Sabaou *et al.* (1980, 1992, 1998). En plus des *Streptomyces*, plusieurs genres d'actinobactéries ont été isolés tels que *Actinomadura* (Badji *et al.*, 2005), *Nocardiopsis* et *Saccharothrix* (Zitouni *et al.*, 2005), *Streptosporangium* (Boudjella *et al.*, 2006), *Nonomuraea* (Badji *et al.*, 2007), *Actinoalloteichus* (Boudjelal *et al.*, 2011), *Actinopolyspora*, *Nocardiopsis*, *Saccharomonospora* et *Streptomonospora* (Meklat *et al.*, 2011), *Bounaguea* (Meklat *et al.*, 2015) etc.

## IV. IMPORTANCE DES ACTINOACTÉRIES

### 1.Importance dans le domaine agronomique

Les actinobactéries ont la capacité de solubiliser certains minéraux insolubles dans la rhizosphère comme le phosphore (Hamdali *et al.*, 2008), de produire des phytohormones, l'acide indole acétique par exemple, et des sidérophores (Macagnan *et al.*, 2008), de protéger les plantes vis-à-vis des infections fongiques par la production des molécules antifongiques.

### 2. Importance dans le domaine médical et vétérinaire

De nombreuses molécules bioactives sont produites par les actinobactéries et ont trouvé une application en thérapie humaine. Ces bactéries ont fourni des composés antitumoraux (Chang *et al.*, 2011), des substances vasodilatatrices, anticholestérolémiques et antihistaminiques, des vitamines (Morel, 1996), des antioxydants (Işık *et al.*, 2007; Saurav *et*

## Partie I: Etude bibliographique

---

Kannabiran, 2012; Karthik *et al.*, 2013) et surtout des antibiotiques (Baltz, 2008). D'autres molécules sont très utilisées en médecine vétérinaire. C'est l'exemple de l'ivermectine produite par *Streptomyces avermitilis*, qui est un antihelminthique (contre les nématodes chez les animaux) (Stapley et Woodruff, 1982).

### 3. Importance dans le domaine écologique

Certains genres d'actinobactéries ont une grande importance dans la dégradation de substances polluantes; c'est l'exemple d'*Arthrobacter*, *Corynebacterium* et *Rhodococcus* qui participent dans la bioremédiation des milieux naturels (Lacey, 1988).

Les actinobactéries interviennent dans la dégradation des hydrocarbures (Essien et Udosen, 2000), dans la minéralisation du phénol et des déchets des industries textiles et de teinture (Bhatena *et al.*, 2002). Certaines substances, comme la pimaricine, sont utilisées pour le traitement des emballages et d'autres pour la protection de certains fromages (Vandamme, 1985).

### 4. Métabolites secondaires sécrétés par les espèces du genre *Streptosporangium*

Le genre *Streptosporangium* est parmi les actinobactéries qui soient peu connues en dehors de leur description taxonomique (Kirby *et al.*, 2011). Bien que les études sur ce genre soient peu nombreuses dans le monde, ces microorganismes demeurent potentiellement une source riche en nouveaux produits commercialement importants, notamment les antibiotiques (Lazzarini *et al.* 2000; Donadio *et al.*, 2002). Plusieurs travaux ont constaté la présence des gènes codant pour les enzymes impliquées dans la biosynthèse des molécules bioactives telles que les "polyketides synthases" (PKS-I, PKS-II) et les "non-ribosomal peptide synthetases" (NRPS) (Gonzalez *et al.* 2005; Janso et Carter, 2010). Les antibiotiques élaborés par les membres de ce genre appartiennent à diverses classes chimiques (anthracyclines, peptides, macrolactames, aromatiques, phénazines, etc.) et beaucoup d'entre eux n'ont pas encore été caractérisés (Intra *et al.* 2014). Certains membres du genre *Streptosporangium* sont aussi une source importante d'enzymes d'intérêt biotechnologique, agronomique, etc., telle les cellulases produites par plusieurs souches de *Streptosporangium* (Mba., 1996), une glucoamylase thermostable, isolée à partir de *Streptosporangium* sp. endophyte de feuille de maïs (Stamford *et al.*, 2002), et une nouvelle Lproline hydroxylase, qui utilise le 2-oxoglutarate comme cofacteur à la place de l'hème ou le NAD (P), isolée à partir de *Streptosporangium roseum* NBRC 3776T (Hara *et al.*, 2014). Cette grande diversité est attribuée probablement à leur long génome, qui atteint 10 369 518 pb chez *S. roseum* selon Nolan *et al.*, (2010), dépassant ceux de quelques espèces de

## Partie I: Etude bibliographique

*Streptomyces* telles que *Streptomyces coelicolor* (8.7 m pb) (Bentley *et al.*, 2002) et *Streptomyces scabies* (10148 695 pb) (Yaxley *et al.* 2009).

**Tableau 3.** Liste de certaines molécules bioactives produites par le genre *Streptosporangium*

Année	Produit et origine	Nature chimique	Propriété	Référence
1969	Sibiromycine <i>S. sibiricum</i>	Benzodiazépine, type anthramycine	Antinéoplastique	Gauze <i>et al.</i> , 1969.
1973	Carminomycine <i>I Streptosporangium</i> sp.	Anthracycline ; type daunomycine	Antinéoplastique, anti-Gram+,anti- protozoaires et anti- levures	Brazhnikova <i>et al.</i> , 1973.
1975	Victomycine <i>S. violaceochromogenes</i>	Glycopeptide, type bléomycine	Antibactérien, antitumoral	Kawamoto <i>et al.</i> , 1975.
1975	Platomycines A et B <i>S. violaceochromogenes</i>	Glycopeptides, type bléomycine	Antibactériens et antitumoraux	Takasawa <i>et al.</i> , 1975.
1975	Streptosporangiomycine <i>S. vulgare</i>	Dérivé de sucre, type everninomycine	Non mentionnée	Coronelli <i>et al.</i> , 1975

1985	DC-87 (A et B) <i>Streptosporangium</i> sp.	Anthracycline, type steffimycine	Non mentionnée	Tomita <i>et al.</i> , 1985.
1987	AI-RC 262 <i>Streptosporangium</i> sp.	oligopeptide, "netropsin-like"	Antifongique	Sato <i>et al.</i> , 1987.
1987	SF-2381 (A et B) <i>Streptosporangium</i> sp.	Dérivés de macrolide	Antibiotique	Ito <i>et al.</i> , 1987.
1990	Sinéfungine <i>Streptosporangium</i> sp. SCC 1786	Peptidyl- nucléoside	Antifongique	Cooper <i>et al.</i> , 1990.
1991	A-84575 <i>S. carneum</i>	Glycopeptide, type ristocétine	Antibactérien	Michel et Yao, 1991.
1993	Sporangirosomycine <i>S.</i> <i>roseum</i> ssp. <i>antibioticus</i>	Peptolide	Antibactérien anti-Gram+	Ghazal et Abd El-Aziz, 1993.
1994	WS-79089 (A, B et C) <i>S. roseum</i>	Angucyclines	Antibiotiques inhibiteurs de ""	Tsurumi <i>et al.</i> , 1994.

# Partie I: Etude bibliographique

---

## V. LES ANTIBIOTIQUES

Les grands progrès réalisés dans le domaine de la chimiothérapie anti-infectieuse, depuis l'âge de la pénicilline et des sulfamides jusqu'à celui des céphalosporines et des nouvelles quinolones, permet actuellement aux médecins de lutter, d'une façon efficace, contre la plupart des agents infectieux. De nos jours, plusieurs antibiotiques sont connus mais leur utilisation croissante tend à entraîner des cas de résistance parfois alarmants, ce qui a exigé la poursuite des recherches dans ce domaine. À l'heure actuelle, des milliers d'antibiotiques sont découverts, dont seulement 2% sont utilisés dans les domaines médical, vétérinaire, agro-alimentaire et agricole (Thiele-Bruhn, 2003).

### 1. Antibiotiques antibactériens

#### 1.1. Antibiotiques naturels

Depuis la découverte de la pénicilline en 1928 par Alexander Fleming, produite par *Penicillium notatum*, d'autres antibiotiques furent recherchés à partir de microorganismes divers.

Waksman passa au crible des milliers de microorganismes; avec Schatz et Bugie, il découvrit la streptomycine (1944) dans des cultures de *Streptomyces griseus* (in Moulin et Coquerel, 1998).

La streptomycine fut expérimentée chez les tuberculeux en plein guerre mondiale et permis de sauver des milliers de vies humaines. Waksman découvrit d'autres antibiotiques importants tels que l'actinomycine, la griséine, la néomycine, etc (in Moulin et Coquerel, 1998).

Dans les années suivant la seconde guerre mondiale, d'autres antibiotiques majeurs furent découverts tels que la polymyxine B (1947) produite par *Bacillus polymyxa*, le chloramphénicol (1948) sécrété par *Streptomyces venezuelae*, la tétracycline (1948), l'érythromycine (1952), la vancomycine (1956), la kanamycine (1957), la lincomycine (1962), etc., élaborés par diverses espèces de *Streptomyces* (in Bergogne-Berezi et Dellamonica, 1999).

#### 1.2. Antibiotiques de synthèse

Beaucoup d'antibiotiques sont fabriqués industriellement par hémisynthèse à partir d'un substrat commun. L'acide 6-aminopénicillanique qui est une pénicilline naturelle obtenue à partir de *penicillium* est rattachée à un radical (R) qui représente les différentes protéines que l'on peut greffer synthétiquement à la pénicilline naturelle afin de diversifier le champ d'action de celle-ci. Certaines bactéries résistantes produisent une enzyme (pénicillinase) pour ouvrir le cycle Bétalactame et rendre ainsi inactive la pénicilline. Des pénicillines d'hémisynthèse tel que la méticilline et l'oxacilline résistent à la pénicillinase (Milcent, 2003).

La céphalosporine C peut également être préparée chimiquement à partir de pénicillines G, mais il est moins coûteux de la produire par fermentation en utilisant le champignon *Acremonium*



## Partie I: Etude bibliographique

---

*chrysogenum*. La biosynthèse s'effectue via la formation de la pénicilline N. plusieurs méthodes chimiques permettent de passer du cycle thiazolidine des pénicillines au cycle dihydrothiazine des céphalosporines. Différentes acylations chimiques permettent de créer diverses céphalosporines d'hémisynthèse qui ont des activités plus variées que les produits naturels (Milcent, 2003).

### 2. Antibiotiques antifongiques

#### 2.1. Antifongiques naturels

Selon la nature des molécules antifongiques, nous distinguons deux groupes: les antifongiques de structure polyénique, actifs essentiellement contre les champignons, et par opposition, les antifongiques de structure non polyénique pouvant être antifongiques uniquement ou plus souvent antifongiques et antibactériens à la fois (Berdy *et al.*, 1987; Berdy, 2005).

#### 2.2 . Antifongiques de synthèse

Avant 1950, les fongicides utilisés étaient, soit des produits minéraux tels que les sels de métaux lourds (mercure, argent, zinc, etc.) ou des produits chlorés ou iodés, soit des composés organiques tels que les acides gras, les composés phénoliques, les dérivés benzoïques, les colorants et les dérivés de la quinoléine (Hamoir *et al.*, 2001). Les fongicides apparus après 1950,appartiennent aux familles suivantes: benzimidazoles, guanidines, morpholines, anilides, acylaluminés, triazolés, imidazolés, pyrimidines, décarboximides et phosphates (Brent, 1984; Koltin et Hitchcock, 1997).

## Partie II: Matériel et méthodes

---

### I. MATERIEL

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

##### 1.1. Souches du genre *Streptosporangium*

Sept (7) souches de *Streptosporangium* (Sg1,Sg3B,Sg10B,Sg11,Sg12,Sg13,Sg20,)provenant de la collection des microorganismes du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM). Ces souches ont été isolées à partir des échantillons des sols sahariens d'Algérie par [Chaabane Chaouch \(2014\)](#), et cela grâce à des agents sélectifs comme le prétraitement du sol par la chaleur sèche à 120 °C, la polymyxine comme agent spécifique pour l'isolement des souches appartenant à ce genre, et le lysozyme. L'isolement a été réalisé après incubation à 30 °C pendant 30 jours sur le milieu chitine-vitamines- B agar (Ch-VB) préconisé par [Hayakawa et Nonomura \(1987\)](#).

##### 1.2. Microorganismes-cibles

Pour cette étude,nous avons utilisé quatre souches bactériennes à gram positif appartenant à l'espèce *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213, MRSA 639c, MRSA 3).et *Bacillus subtilis* (Bs) ,quatre champignons filamenteux: *Fusarium culmorum* (Fc). *Aspergillus carbonarius* (AC) ,*Umbelopsis ramanniana* (UR) et Une levure: *Candida albicans* (M3).

### II. METHODES

#### 1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches du genre *Streptosporangium* sur milieu solide ( Méthodes des cylindres d'agar)

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

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

A partir d'une culture de 24 h sur le milieu GN (voir composition en annexe), une suspension de chaque germe cible (MRSA 639c, MRSA 3, *S.aureus* ATCC 43300 et *S.aureus* ATCC 29213,.BS ) est préparée dans 10 mL d'eau distillée stérile. Les suspensions sont ensuite incorporées dans 20 mL de milieu de culture (GN) à raison de différents volumes (50 µL, 100 µL, 150 µL et 200 µL), puis coulées dans des boîtes de Pétri stériles. Après 24 h d'incubation à 30 °C, le volume qui donne une croissance du germe sous forme d'une nappe avec des colonies juxtaposées sera retenu pour le test d'antagonisme (100 µL/100mL de milieu de culture).

## Partie II: Matériel et méthodes

### 1.2. Préparation et calibration des suspensions fongiques

A partir d'une culture de 48h sur milieu ISP2(voir composition en annexe), une suspension de chaque germe cible( FC , AC ,UR et M3) est préparée dans 10 mL d'eau distillée stérile. Les suspensions sont ensuite incorporées dans 20 mL de milieu de culture (ISP2) à raison de différents volumes (50  $\mu$ L, 100  $\mu$ L, 150  $\mu$ L et 200  $\mu$ L), puis coulées dans des boites de Pétri stériles. Après 48 h d'incubation à 30 °C, le volume qui donne une croissance du germe sous forme d'une nappe sera retenu pour le test d'antagonisme (100  $\mu$ L/100mL de milieu de culture).

### 1.3. Test de l'activité antagoniste

Cette méthode consiste d'abord à ensemencer les actinobactéries en stries très serrées et d'une manière homogène à la surface de deux milieux de culture: le milieu ISP2 et le milieu Bennett (Warren *et al.*, 1955) (voir composition en annexe n°1). Les boites sont incubées à une température de 30 °C pendant 10 jours pour permettre aux actinobactéries de croître et de sécréter leurs composés actifs. Des cylindres d'agar de 10 mm de diamètre sont ensuite prélevés à l'aide d'un emporte-pièce et déposés sur la surface du milieu GN semi solide (contient 12 g/L d'agar, pour faciliter la diffusion des composés antibactériens) pré-ensemencé par le germe. Les boîtes sont mises 2 h à 4 °C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats se fait en mesurant le diamètre de la zone d'inhibition autour des cylindres après 24 h d'incubation.

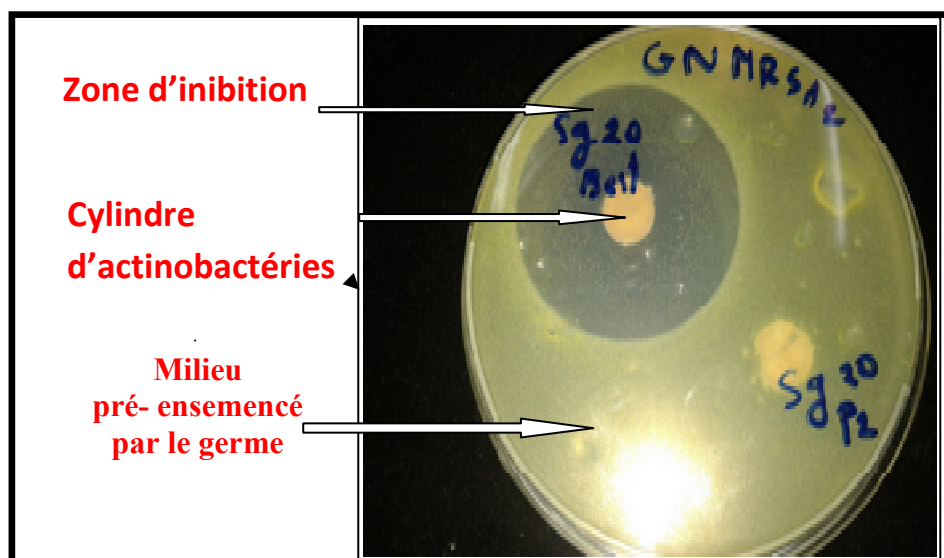


Figure 2. La méthode des cylindres d'agar

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

D'après les résultats de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes sur milieux solides (ISP2 et Bennett), nous avons choisi le meilleur milieu de production d'antibiotiques pour chaque souche en vue d'étudier leur cinétique de croissance et d'activité antimicrobienne en milieu liquide. Les cinétiques de culture et de production des composés antibactériens ont été effectuées sur le milieu Bennett liquide. Il a été choisi comme meilleur milieu de production des composés antimicrobienne, au lieu du milieu ISP2, car il a donné de meilleurs résultats lors des tests préliminaires sur le milieu solide.

#### 2.1. Pré-cultures

La pré-culture est obtenue en raclant les spores à partir de la culture d'une souche d'actinobactérie âgée de 10 jours en croissance, et inoculés dans des Erlenmeyers de 250 ml contenant 50 ml de milieu de culture (Bennett liquide). Ces Erlenmeyers ont été incubés sous agitation dans un shaker à 250 rpm et à une température de 30 °C pendant 48h.

#### 2.2. Suivi de la croissance et de la production des composés antibactériens

La cinétique de production des antibiotiques a été réalisée en vue de déterminer le jour optimal de production dans des conditions déterminées. Des fioles d'Erlenmeyer de 500 mL contenant chacune 100 mL de milieu liquide (pH 7,2) sontensemencées chacune avec 1 mg ( $\pm$  0,2mg) d'actinomycète contenu dans 3 mL de la pré-culture. Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 250 rpm dans un Shaker. Des prélèvements sont effectués toutes les 24 h pendant 10 jours pour être analysés. L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est suivie quotidiennement.

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

L'activité antibiotique est déterminée par la méthode de diffusion des puits contre *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (*S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213, MRSA 639c, MRSA 3). *Bacillus subtilis* (Bs) champignons filamenteux: *Fusarium culmorum* (Fc). *Aspergillus carbonarius* (AC), *Umbelopsis ramanniana* (UR) et Un levure: *Candida albicans* (M3). Des prélèvements quotidiens (2 mL prélevés en double) ont été réalisés dans des Eppendorfs stériles (séchés et pesés). Ces derniers ont été soumis à une centrifugation de 12 000 rpm pendant 10 min dans une mini centrifugeuse (Sigma). Le surnageant est utilisé pour tester les activités antibactériennes. Cette activité déterminée par la méthode de diffusion des puits. Cette méthode consiste à utiliser un milieu GN semi solide (12 g/L), pré-ensemencé avec le germe-cible (150  $\mu$ L) avant d'être coulé en boîtes de Pétri. Après solidification du

## Partie II: Matériel et méthodes

---

milieu, des puits sont conçus à l'aide d'un emporte-pièce stérile de 10 mm de diamètre. 100 µL de surnageant de culture à analyser, est prélevée stérilement à l'aide d'une micropipette (embout stérile) puis introduite dans le puits. Les boîtes sont mises au réfrigérateur (4 °C pendant 2 h) afin de laisser les composés antibactériens diffuser dans la gélose tout en inhibant momentanément la croissance des germes cibles, et puis incubé à 37 °C. La lecture des résultats se fait en mesurant la zone d'inhibition autour du puits après 24 h d'incubation, et pour les champignons (ISP2 semi solide (12 g/L), et puis incubé à 30 °C. La lecture des résultats se fait en mesurant la zone d'inhibition autour du puits après 48 h d'incubation) .

### 3. Extraction des composés antibactériens et antibiographie

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

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

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

Les cultures sont réalisées en milieux Bennett . Au total, 500 mL par milieu sont répartis dans des erlenmeyer de 500 mL contenant chacun 100 mL de milieu; pH = 7,5; agitation = 250 rpm; température = 30°C. Au jour optimal de production d'antibiotiques, les filtrats sont répartis en 4 fractions de 60 mL extraites chacune avec 60 mL de solvant. Les phases organiques sont séparées des phases aqueuses, puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (Whatman n° 1) contenant du sulfate de sodium anhydre (entonnoir + papier filtre + 2 g de sulfate de sodium) afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles.

Les extraits sont évaporés sous vide à 40 °C à l'aide d'un évaporateur rotatif puis repris dans 1 mL de méthanol. Afin de tester l'activité antagoniste, des disques de papier de 6 mm de diamètre sont imprégnés de 80 µL d'extrait à tester. Ces disques ont été séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid pour faire évaporer le méthanol. La phase aqueuse obtenue après une double extraction au *n*-butanol, est également testée par antibiographie pour estimer l'activité résiduelle non extraite.

#### 3.2. Extraction à partir du mycélium

La méthode utilisée est celle de [Mechlinski \(1978\)](#). Le mycélium recueilli après centrifugation des cultures, est lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis égoutté. Un gramme de mycélium humide est extrait par 50 ml de méthanol, sous agitation durant 2 h à température ambiante. Après filtration sur verre fritté n° 4, l'extrait méthanolique est évaporé à 40 C° à l'aide

## Partie II: Matériel et méthodes

---

d'un rotavapor rotatif sous vide, puis récupéré dans 1 ml de méthanol afin de le tester par antibiographie.

### 3.3. Antibiographie

Cette expérience nous permettra de connaître le meilleur solvant d'extraction pour la suite de notre travail. Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture et du mycélium sont testés contre les microorganismes-cibles choisis. Des disques en papier de 6 mm de diamètre ([Institut Pasteur, Paris](#)) sont imbibés par 80 µl d'extrait organique, puis séchés totalement à l'aide d'un séchoir à froid. Les disques sont ensuite stérilisés sous UV (254 nm) durant 45 min sous hotte axénique avant d'être déposés stérilement à la surface du milieu GN (12 g/L d'agar), préalablement ensemencé par le germe-test. Les boîtes sont ensuite mises 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des produits actifs, puis incubées à 30°C. Des disques témoins imbibés par les solvants utilisés lors de l'extraction et séchés dans les mêmes conditions ont été testés. La phase aqueuse est également testée par antibiographie (même conditions) pour estimer l'activité résiduelle non extraite.

La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h d'incubation à 30°C et consiste à déterminer le diamètre de l'auréole d'inhibition autour du disque. Le solvant permettant d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé est considéré comme le meilleur solvant d'extraction.

### 4. Purification des molécules antibactériennes par HPLC

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

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

Un injecteur automatique de type JASCO AS2055, relié à une boucle d'injection de 100 µL.

Une pompe binaire de type JASCO type PU-2080.

Un dégazeur.

Un détecteur UV-Visible dual bande type UV-1575.

Une interface numérique d'acquisition des données.

Une colonne semi-préparative Waters XBridge de type C18 (200 × 10 mm, granulométrie 5µm) ; précédé d'une pré-colonne Waters XBridge C18 (10 × 10 mm, 5µm).

Logiciel de pilotage, d'acquisition et d'intégration des données: ChromNAV, chromatography data system. Les conditions suivantes de purification par chromatographie liquide à haute performance (HPLC) ont été déterminées après plusieurs expériences préliminaires. La phase mobile est composée d'eau bidistillée et de méthanol (qualité HPLC) préalablement filtrés et

## Partie II: Matériel et méthodes

---

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

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

## Partie III: Résultats et discussion

### I. ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE GENRE STREPTOSPORANGIUM

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

L'activité antibactérienne de 7 souches de *Streptosporangium* a été testée sur deux milieux solides; ISP2 et Bennett par la méthode des cylindres d'agar; contre quatre souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM): (MRSA 639c, MRSA 3, *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* ATCC 43300) et *Bacillus subtilis* (Bs) Et contre quatre champignons filamenteux: *Fusarium culmorum* (Fc), *Aspergillus carbonarius* (AC); *Umbelopsis ramanniana* (UR) et Un levure: *Candida albicans* (M3).

Les résultats obtenus sont présentés dans les [Figure](#) et dans les [Tableau](#) suivant :



[Figure 3](#). Activité antifongique (A) et antibactérienne (B) par la méthode des cylindres d'agar de quelques souches de *Streptosporangium*



## Partie III: Résultats et discussion

**Tableau 4.** Activité antibactérienne par la technique des cylindres d'agar des souches du genre *streptosporangium* sur les deux milieux solides ISP2 et Bennett.

Souches	Milieux	Activités antibactériennes (mm)					
		MRSA2	BS	MRSA 639c	MRSA 3	<i>S. aureus</i> ATCC 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 29213
Sg1	Bennett	13	15	16	-	11	-
	ISP2	25	14	28	-	11	-
Sg3B	Bennett	14	14	11	-	11	-
	ISP2	29	14	32	-	11	-
Sg10B	Bennett	14	14	-	-	11	-
	ISP2	18	-	22	-	11	-
Sg11	Bennett	13	13	-	-	11	-
	ISP2	30	14	30	-	11	-
Sg12	Bennett	25	13	19	-	11	15
	ISP2	47	25	32	-	23	-
Sg13	Bennett	-	-	-	-	-	-
	ISP2	28	11	30	-	-	-
Sg20	Bennett	45	34	32	-	36	34
	ISP2	-	14	-	-	-	-

**Note:** -: résultat nul, MRSA 639c, MRSA 3, *S. aureus* ATCC 43300, *S. aureus* ATCC 29213: *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline. et *Bacillus subtilis* (Bs)

**Tableau 5.** Activité antifongique par la technique des cylindres d'agar des souches du genre *streptosporangium* sur les deux milieux solides ISP2 et Bennett.

Souches	Milieux	Activités antifongique(mm)*			
		M3	AC	FC	UR
Sg1, Sg3B, Sg10B, Sg11, Sg12, Sg13.	Bennett	-	-	-	-
	ISP2	-	-	-	-
Sg20	Bennett	-	-	20	20
	ISP2	12	17	20	16

**Note:** -: résultat nul . *Fusarium culmorum* (Fc). *Aspergillus carbonarius* (AC) ;

(UR) *Umbelopsis ramanniana* et *Candida albicans* (M3): champignons filamenteux.

\* Le diamètre du disque est inclus.

Toutes les souches de *streptosporangium* ont montré une activité antibactérienne sur au moins d'un des deux milieux testés (le diamètre entre 11 et 47mm).

Les activités les plus fortes ont été obtenues par les souches Sg12 et Sg20 développées sur le milieu ISP2 (45 et 47mm respectivement contre MRSA2).

La souche MRSA3 n'est sensible à aucune des souches des *streptosporangium* testées.

Le milieu ISP2 a permis d'obtenir les meilleures activités pour les souches (Sg1, Sg3B, Sg10B, Sg11, Sg12, Sg13) . par contre le milieu Bennett était nettement mieux pour la souche Sg20 .

Une activité antifongique moyenne a été obtenue seulement par la souche Sg20 .

## Partie III: Résultats et discussion

---

D'après les études de [Chaabane Chaouch, \(2014\)](#), le milieu Bennett est nettement favorable pour la production des métabolites secondaires. L'activité des souches d'actinobactéries varie suivant les milieux de culture. Une faible modification de la composition du milieu de culture peut favoriser ou inhiber cette production ([Messaoudi, 2013](#)).

Tous les isolats de *Streptosporangium* isolés par [Boudjella \(2007\)](#) et [Bouti \(1997\)](#), à partir de sols sahariens, sont montrés actifs contre les champignons et les bactéries à Gram positif.

Le genre *Streptosporangium* est connu comme recelant des souches et des espèces productrices de plusieurs antibiotiques d'une grande diversité structurale et à spectre d'action intéressant.

Parmi ces métabolites bioactifs, il y'a des composés anti-tumoraux comme la sporomycine de *S. pseudovulgare* ([Umezawa et al., 1976](#)), des composés à activité à la fois antibactérienne et antifongique ([Hacène et al., 1998](#); [Boudjella et al., 2006](#)).

Les souches appartenant au genre *Streptosporangium* sont connues pour produire des métabolites bioactifs, dont beaucoup n'ont pas encore été caractérisés ([Intra et al., 2014](#)). Plusieurs d'entre elles sont isolées à partir d'habitats différents, et ont présenté des activités biologiques intéressantes (antibiose, contre MRSA, activité antifongique, production d'enzymes, etc.).

La production d'antibiotiques chez les membres de la famille des *Streptosporangiaceae*, auxquels appartiennent le genre *Streptosporangium*, est estimée à environ 6 % des souches appartenant à des genres rares ([Lazzarini et al., 2000](#)).

En général, l'activité des souches de *Streptosporangium* est variable d'un isolat à un autre, selon le milieu de culture; pour certaines souches, c'est le milieu ISP2 et pour d'autres, c'est le milieu de le Bennett ([Badji, 2006](#); [Lamari 2006](#); [Boudjella, 2007](#); [Belghit, 2010](#); [Driche, 2010](#); [Khébizi, 2010](#); [Toumatia, 2010](#); [Aouiche, 2011](#); [Yekkour, 2013](#); [Goudjal, 2014](#)).

Vu leur potentiel génétique intéressant, la découverte d'une nouvelle espèce de *Streptosporangium* offre la possibilité d'obtenir éventuellement de nouveaux métabolites, ce qui encourage la poursuite des recherches dans cet axe et notamment l'étude des antibiotiques de Sg20 qui est de nouvelles espèces.

## II. PRODUCTION DE MOLECULES ANTIBACTERIENNES EN MILIEU LIQUIDE

### 1. Cinétiques de production des composés antibactériens, de croissance et de pH de la souche *Streptosporangium sp* (Sg20)

Une cinétique de croissance et de production d'antibiotiques de la souche *Sg20* a été effectuée

## Partie III: Résultats et discussion

sur le milieu Bennett liquide. Au cours de la fermentation, la mesure de la biomasse et du pH a été déterminée quotidiennement pendant 10 jours par la méthode de diffusion des puits.

contre les souches de *Staphylococcus aureus* (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213) et *Bacillus subtilis* (Bs); et un champignon filamenteux : *Umbelopsis ramanniana* (UR) qui ont été choisies comme germes-cibles.

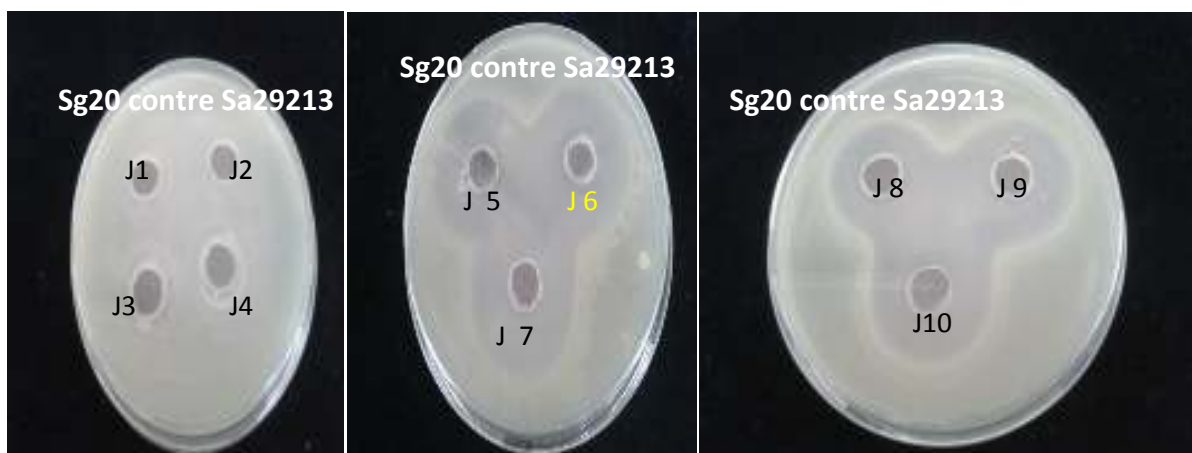
La production débute dès le 3<sup>ème</sup> jour (13.66mm) contre la souche MRSA 639c, elle augmente et atteint un maximum le 6<sup>ème</sup> jour (22mm).

L'activité contre *S. aureus* ATCC 43300 débute dès le 3<sup>ème</sup> jour (25.66mm) et atteint son maximum le 6<sup>ème</sup> jour (31 mm).

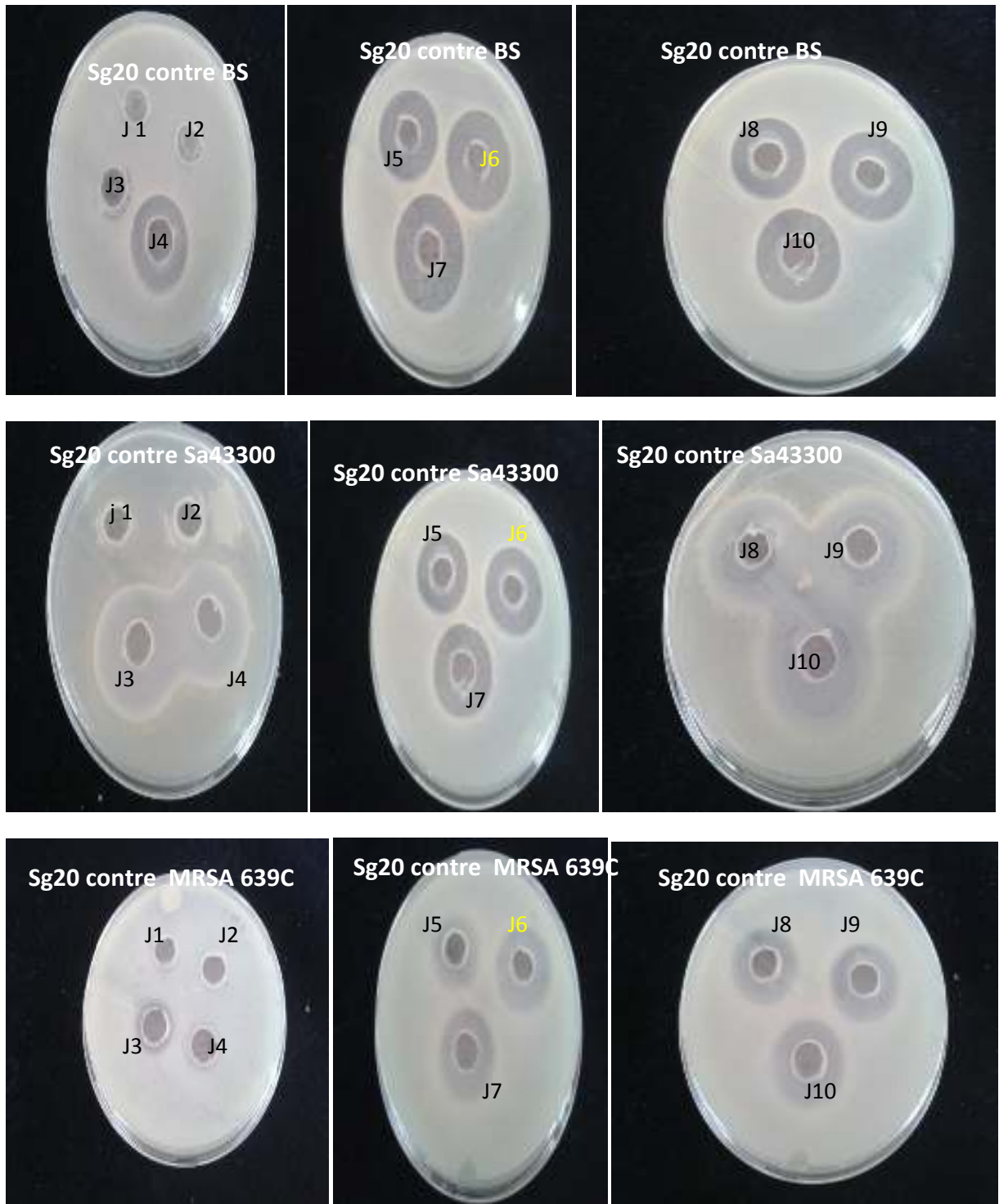
L'activité contre *S. aureus* ATCC 29213 apparait le 3<sup>ème</sup> jour (18), et atteint son maximum le 6<sup>ème</sup> jour (27mm), Puis diminue légèrement .

L'activité antibactérienne contre *Bacillus subtilis* (Bs) est détectée dès le 3<sup>ème</sup> jour (17.66mm), elle augmente le 4<sup>ème</sup> jour (20mm) et atteint le maximum le 6<sup>ème</sup> jour (24mm), une stabilisation de l'activité est observée entre le 6<sup>ème</sup> et le 10<sup>ème</sup> jour .

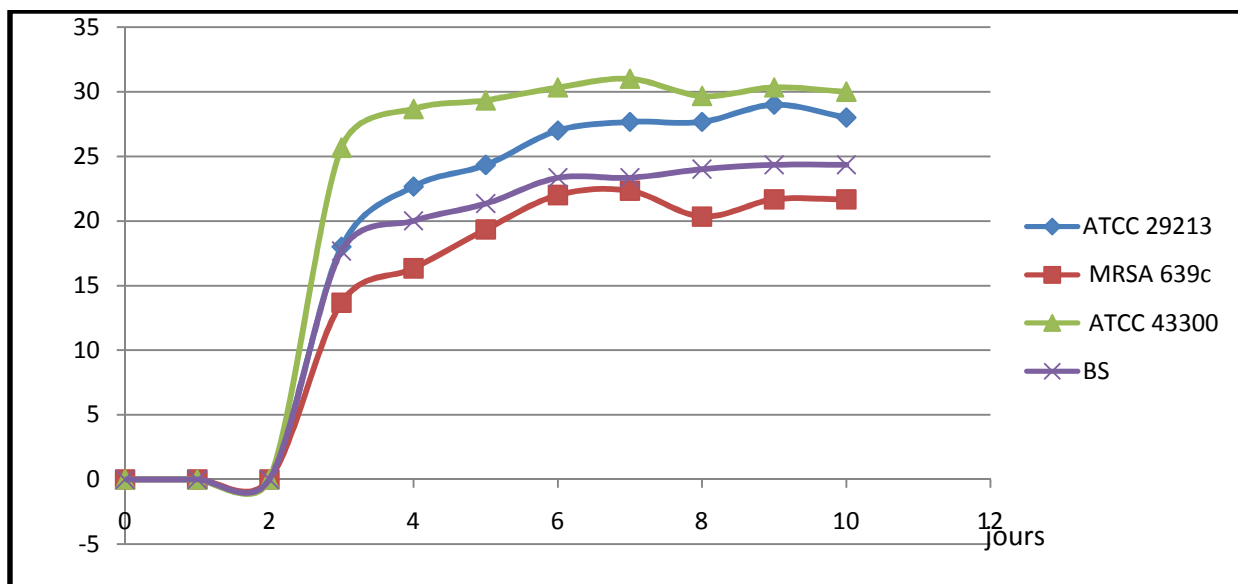
Aucune activité antifongique sur le milieu liquide testés contre *Umbelopsis ramanniana* (UR) n'a été obtenue. Les résultats sont illustrés dans la [Figure 4](#).



## Partie III: Résultats et discussion



**Figure 4 .** Mise en évidence de l'activité antibactérienne et antifongique de la souche sg20 par la méthode des puits contre les souches SARM (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 29213 et *S. aureus* ATCC 43300) et BS ; UR; du jour 1 au jour 10 .



**Figure 5.** Cinétiques de l'activité antibactérienne, de la souche Sg20 dans le milieu Bennett, contre (MRSA 639c, *S. aureus* ATCC 43300 et *S. aureus* ATCC 29213) et BS.

### III. EXTRACTION DES COMPOSES ANTIBACTERIENS ET ANTIBIOGRAPHIE

#### 1. Extraction des composés antibactériens par la souche *Streptosporangium sp* (Sg20) .

##### 1.1. Extraction à partir du filtrat de culture de la souche Sg20

L'extraction des antibiotiques à partir du filtrat de culture nécessite le choix d'un solvant non miscible à l'eau. Quatre solvants de polarité croissante sont testés :

(*n*-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et *n*-butanol) . Un volume de 60 mL de filtrat de chaque culture est extrait par un volume de 60 mL de solvant, les extraits organiques sont concentrés à sec, puis récupérés dans 1 mL de méthanol pour tester leur activité par la méthode des disques de papier (80  $\mu$ L par disque) contre les souches MRSA 639c ;BS et UR . Les résultats des phases organiques sont illustrés dans le [Tableau 6](#).

D'après les résultats , le choix du meilleur solvant d'extraction des composés antibactériens s'est fait. les extraits organiques sont actifs contre la souche MRSA 639c et BS et ne sont pas active contre UR, d'après ces résultats il s'est avéré que le meilleur solvant d'extraction pour la souche Sg20 est le *n*-butanol avec une zone d'inhibition de 20mm pour MRSA639c et de 21mm pour BS , suivi par l'acétate d'éthyle de 15mm et 19mm respectivement, puis le dichlorométhane par

## Partie III: Résultats et discussion

un valeur égal de 9mm et l'hexane avec des zones d'inhibitions de 00 mm(MRSA 639c et BS) , mais l'acétate d'éthyle a été choisie préférentiellement comme meilleur solvant pour l'extraction des composés antibactériens secrétés par la souche Sg20 car Le pouvoir d'extraction du *n*-butanol est tellement élevé qu'il extrait malheureusement aussi beaucoup d'impuretés, ce qui peut parfois rendre la purification finale assez difficile (Lamari, 2002a; Zitouni, 2005; Merrouche *et al.*, 2010). Pour cela, d'autres chercheurs ont choisi des solvants moins polaires, comme le dichlorométhane ou l'acétate d'éthyle (Aouiche, 2013; Boubetra, 2013).

La phase aqueuse de *n*-butanol a été concentrée à sec, puis récupérée dans l'eau, et après une anti biographie les résultats ont montré la présence d'une activité antibactérienne dont la zone d'inhibition est de 15mm pour MRSA639c et de 17mm pour BS.

**Tableau 6.** Résultats des tests d'activité par antibiographie pour la souche Sg20 contre la souche MRSA 639c ;BS et UR des extraits organiques, de la phase aqueuse et du mycélium, les chiffres correspondent aux zones d'inhibitions en mm.

Souche	Extraits organiques					
	<i>n</i> -hexane	Dichlorométhane	Acétate d'éthyle	<i>n</i> -butanol	Phase aqueuse	Mycélium
MRSA639c	00	09	15	20	15	13
BS	00	9	19	21	17	15
UR	00	00	00	00	00	00

### 1.2. Extraction à partir du mycélium

Les résultats illustrés par le **Tableau 6** montrent que:

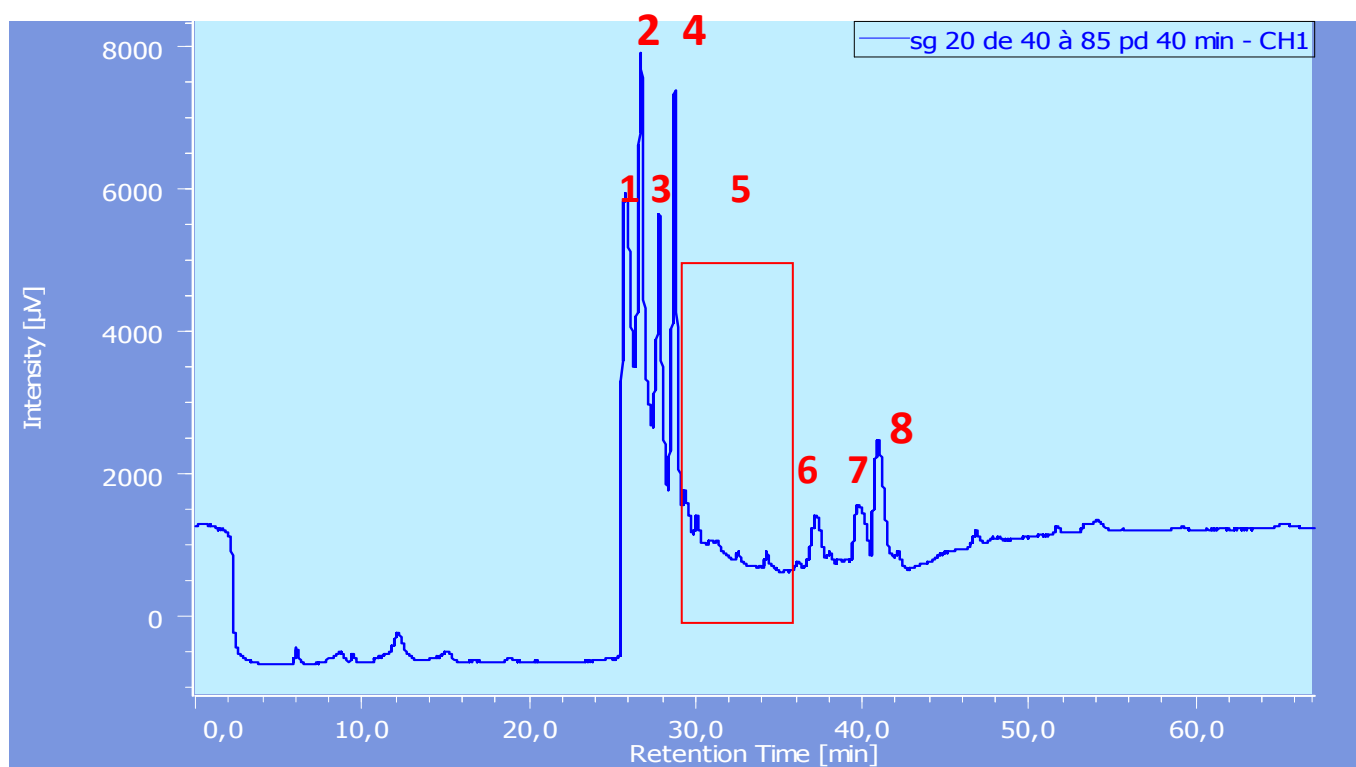
L'extraits méthanolique du mycélium a montré la présence d'une activité antibactérienne contre MRSA 639c, avec une zone d'inhibition de 13mm et contre BS avec une zone d'inhibition de 15mm .

Les composés antibactériens de La souche Sg20 sont produits dans le milieu de culture; ont noté la présence d'activités antimicrobiennes dans le filtrat de culture et aussi dans le mycélium des souches *Streptosporangium sp.*

## IV. PURIFICATION DE COMPOSES ANTIBACTERIENS DE LA SOUCHE *Streptosporangium sp* (Sg20) PAR HPLC

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

L'analyse par HPLC de l'extrait au acétate d'éthyle (meilleur solvant d'extraction) du filtrat de culture de la souche Sg20 a donné plusieurs pics, dont cinq pics sont principaux (pics 1, 2, 3, 4 et 8), le temps de rétention de chaque pic est : 26, 27, 27.5, 28 et 41,8 min respectivement. Et trois pics secondaires (pics 5, 6 et 7) avec des temps de rétention allant de 28.5 à 35,5 min (pics 5) et 37 et 40 min (pics 6 et 7) (Figure 6).



**Figure 6.** Profils chromatographiques des extraits organiques du filtrat de culture de la souche Sg20 solubilisé dans du méthanol (colonne waters C18, gradient méthanol-eau, débit: 1 mL/min; détection: 220 nm).

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

## Partie III: Résultats et discussion

Les fractions des pics 3,7 et 8 présentent une forte activité, contrairement aux fractions des pics 1, 4, 5 et 6 qui ont montré une activité moyenne contre MRSA 639c. Pour le pic 2 aucune activité n'a été obtenue.

Les fractions des pics secondaires représentés par activité est aussi importante comparativement à celle des pics principaux 1, 2 et 4.

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

Fractions purifié par HPLC	Diamètre de la zone d'inhibition (mm)
Pic 1	11
Pic 2	0
Pic 3	19
Pic 4	10
Pic 5	9
Pic 6	12
Pic 7	19
Pic8	21

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

Les substances antibactériens de la souche Sg20 sont produits dans le milieu de culture; et à l'intérieur du mycélium., pour confirmer ces résultats une analyse par HPLC a été effectuée. la présence de 8 pics, sont les mêmes pics présents dans l'extrait Acétate d'éthyle avec les mêmes temps de rétention.

L'analyse par HPLC a montré la présence de 8 pics obtenue à partir du filtrat de culture extraite au Acétate d'éthyle, qu'ils sont tous actifs contre MRSA639c, cela peut signifier la présence de 8 composés antibactériens différents que sont secrétés par les espèces de ce genre. Les résultats obtenus à travers cette étude; donnée l'importance des sols sahariens algériens comme source d'actinobactéries potentiellement productrices de nouvelles substances actives contre les bactéries multi-résistantes et les champignons filamenteux.



## Conclusions et perspectives

---

L'étude du pouvoir antagoniste des 07 souches de *Streptosporangium* sp .a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar basée sur la mise en évidence de l'activité antibiotique des souches sur deux milieux solides (Bennett et ISP2) contre diverse souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline(MRSA3 ,MRSA 639c ,*S aureus* ATCC43300 , *S aureus* ATCC29213) et *Bacillus subtilis* (Bs) et quatre champignons filamenteux : *Fusarium culmorum*(Fc),*Aspergillus carbonarius*(AC),*Umbelopsis ramanniana* (UR),et une levure : *Candida albicans* (M3).

Tous les isolats sont doués d'une activité antibactérienne et antifongique moyenne à forte,contre les bactéries et parfois contre les levures .la souche Sg20 , ont montré une forte activité antibactérienne et antifongique, pour cette raison , elle a l'objet d'une cinétique de production de composés antibactériens sur le milieu complexe liquide Bennett à 30°C mené en conditions d'agitation permanente à 250 rpm pendant 10 jours.

La production maximale des antibiotiques est obtenue à le 6<sup>ème</sup> Jour, la souche Sg20 de *Streptosporangium* sp, sécrète des antibiotiques qui ont été mis en évidence dans le filtrat de culture et dans le mycélium. Les antibiotiques (antibactériens) présents dans le filtrat de culture sont extractibles par l'acétate d'éthyle.

L'analyse par HPLC de l'extrait au acétate d'éthyle (meilleur solvant d'extraction ) du filtrat de culture de la souche Sg20 a donné plusieurs pics, dont cinq pics sont principaux (1,2,3,4et8),et trois pics secondaires (5 ,6 et 7),la pic 2 ne présente aucune activité contre MRSA639c .cela peut signifier la présence de 7 composés antibactériens sécrétés par la souche Sg20 .

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses .Elle encouragent la poursuite des études :

- \* La purification des composés antibactériens et la détermination de leur structure chimique après étude spectroscopique.
- \* La réalisation de certains tests complémentaires tels que la toxicité , la solubilité, la stabilité , ect
- \* La détermination des concentrations minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques.

## Conclusions et perspectives

---

L'étude du pouvoir antagoniste des 07 souches de *Streptosporangium* sp .a été effectuée par la méthode des cylindres d'agar basée sur la mise en évidence de l'activité antibiotique des souches sur deux milieux solides (Bennett et ISP2) contre diverse souches de *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline(MRSA3 ,MRSA 639c ,*S aureus* ATCC43300 , *S aureus* ATCC29213) et *Bacillus subtilis* (Bs) et quatre champignons filamenteux : *Fusarium culmorum*(Fc),*Aspergillus carbonarius*(AC),*Umbelopsis ramanniana* (UR),et une levure : *Candida albicans* (M3).

Tous les isolats sont doués d'une activité antibactérienne et antifongique moyenne à forte,contre les bactéries et parfois contre les levures .la souche Sg20 , ont montré une forte activité antibactérienne et antifongique, pour cette raison , elle a l'objet d'une cinétique de production de composés antibactériens sur le milieu complexe liquide Bennett à 30°C mené en conditions d'agitation permanente à 250 rpm pendant 10 jours.

La production maximale des antibiotiques est obtenue à le 6<sup>ème</sup> Jour, la souche Sg20 de *Streptosporngium* sp, sécrète des antibiotiques qui ont été mis en évidence dans le filtrat de culture et dans le mycélium. Les antibiotiques (antibactériens) présents dans le filtrat de culture sont extractibles par l'acétate d'éthyle.

L'analyse par HPLC de l'extrait au acétate d'éthyle (meilleur solvant d'extraction ) du filtrat de culture de la souche Sg20 a donne plusieurs pics, dont cinq pics sont principaux (1,2,3,4et8),et trois pics secondaires (5 ,6 et 7),la pic 2 ne présente aucune activité contre MRSA639c .cela peu signifie la présence de 7 composés antibactériens secrété par la souche Sg20 .

Les perspectives qui découlent de ce travail sont nombreuses .Elle encouragent la poursuite des étude :

- \* La purification des composés antibactériens et la détermination de leur structure chimique après étude spectroscopique.
- \* La réalisation de certains test complémentaires tes que la toxicité , la solubilité, la stabilité , ect
- \* La détermination des concentration minimales inhibitrices (CMI) des antibiotiques.

### Références bibliographiques

**Aouiche A.** (2013). Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de *Streptomyces* et de *Saccharothrix* des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigène pour l'Homme. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.

**Badji B.** (2006). Etude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de Doctorat Es-Sciences, option Microbiologie, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.

**Badji B., Mostefaoui A., Sabaou N., Lebrihi A., Mathieu F., Seguin E. and Tillequin F.** (2007). Isolation and partial characterization of antimicrobial compounds from a new strain *Nonomuraea* sp. NM94. *J. Ind. Microbiol.*, 34 (6): 403-412.

**Badji B., Riba A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N.** (2005). Antifungal activity of a Saharan *Actinomadura* strain against various pathogenic and toxinogenic fungi. *J. Med. Mycol.*, 15 (4): 211-219.

**Badji B., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Sabaou N.** (2006). Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp., AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can J Microbiol* 52:373–382.

**Becker B., Lechevalier M. P., Gordon R. E. and Lechevalier H. A.,** (1965). chemical composition of cell-wall preparations from strains of various from genera of aerobic actinomycetes. *Appl. Microbiol.*

**Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., Bateman A., Brown S. C., Chen C.W., Collins M., Cronin A., Fraser A., Goble A., Hidalgo J., Hornsby T., Howarth S., Huang C.H., Kieser T., Larke L., Murphy L., Oliver K., O'Neil S., Rabinowitsch E., Rajandream M.A.R., K., Rutter S., Seeger K., Saunders D., Sharp S., Squares R., Squares S., Taylor K., Warren T., Wietzorrek A., Woodward J., Barrell B.G., Parkhill J. and Hopwood D.A.** (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3(2). *Nature.*, 417(6885): 141-7.

**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.

**Boubetra D.** (2013). Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques sécrétés par *Saccharothrix* sp. SA198 Thèse de Doctorat. Ecole Nationale Supérieure Agronomique, El-Harrach, Alger.

## Références bibliographiques

---

- Boudjella H. (1994).** Influence des milieux de culture, des antibiotiques et du pré-traitement des échantillons à la chaleur sur la sélection des genres et des espèces d'actinomycètes rares de quelques sols sahariens. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba.
- Boudjella H., Bouti K., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A. and Sabaou N. (2006).** Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res.*
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A. & Sabaou(2007).** Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil *Journal of Applied Microbiology* ISSN., 1364-5072.
- Boudjella H. (2007).** Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques. Institut National Agronomique, El-Harrach, Alger.
- Boudjella H., Zitouni A., Coppel Y., Mathieu F., Monje M.C., Sabaou N. and Lebrihi A. (2010).** Antibiotic R2, a new angucyclinone compound from *Streptosporangium* sp. Sg3. *J. Antibiot.*, 63.
- Chaabane Chaouch F. (2014).** Taxonomie et propriétés antagonistes de quelques souches de *Planomonospora* et de *Streptosporangium* isolées des sols sahariens. Mémoire de Magister en Microbiologie, option microbiologie appliquée, E.N.S. de Kouba. 1. 3.21.99 p.
- Chargaff E. (1950).** Chemical specificity of nucleic acids and mechanism of their enzymatic degradation. *Experientia*, 6: 201 -209.
- Couch J. N. (1955).** A new genus and family of the Actinomycetales, with a revision of the genus *Actinoplanes*. *J Elisha Mitchell Sci Soc.*, 71,148–155.
- Driche E. (2010).** Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en microbiologie, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger.
- Ensign J.C., Normand P., Burden J.P. and Yallop C.A. (1993).** Physiology of some actinomycetes genera. *Res. Microbiol.*
- Escalante L., Gonzalez R., Obregon A. M. and Sanchez S. (1992).** Carbon catabolite regulation of gentamicin formation. *J. Antibiot.*
- Genilloud O. (2014).** The re-emerging role of microbial natural products in antibiotic discovery. *Antonie van Leeuwenhoek.*,106:173–188.
- Goodfellow, M. and Williams, S.T. (1983).** Ecology of actinomycetes. *Annual Review of Microbiology.*

## Références bibliographiques

---

- Goodfellow M., Stanton L.J., Simpson K.E. and Minnikin D.E. (1990).** Numerical and chemical classification of *Actinoplanes* and some related actinomycetes. *J. Gen. Microbiol.*, 136, 19-36.
- Goodfellow M. (2012).** Actinobacteria phyl. nov. *In*: Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.J., Trujillo M.E., Ludwig W., Suzuki K.i., Parte A (Eds). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York.* p. 33.
- Hacène H., Boudjellal F. and Lefebvre G. (1998).** AH7, a non polyenic antifungal antibiotic produced by a new strain of *Streptosporangium roseum*. *Microbios.*, 96, 103-109.
- Hacène H., Sabaou N., Bounaga N. and Lefebvre G. (1994).** Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios.*, 79, 81-85.
- Hamedi J., Mohammadipanah F., Jan M. V., Pötter G., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P. and Kroppenstedt R. M. (2010).** *Nocardiosis sinuspersici* sp. nov., isolated from sandy rhizospheric soil. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.*
- Hayakawa M. and Nonomura H. (1987).** Humic acid-vitamin agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *Journal of Fermentation Technology.*, 65, 501–509
- Intra B., Matsumoto A., Inahashi Y., Omura S., Panbangred W., and Takahashi Y., (2014).** *Streptosporangium jomthongense* sp. nov., an actinomycete isolated from rhizospheric soil and emendation of the genus *Streptosporangium*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 64, 2400–2406.
- Jose P.A., Jebakumar S.R.D. (2013).** Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbi.*, 4: 240.
- Kämpfer P., Glaeser SP., Grun-Wollny I. and Busse H.J. (2013).** *Streptosporangium sandarakinum* sp. nov. *Int J Syst Evol Microbiol.*, 63:2484–2489.
- Lahoum A. (2014).** Taxonomie et activités antimicrobiennes de quelques souches d'*actinomadura*, de *Nonomuraea*, de *Nocardiosis* et de *Saccharothrix* isolées des sols d'adras, de béni-abbès et du hoggar. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba.
- Lamari L. (2006).** Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. These de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou.
- Lamari L., Zitouni A., Boudjella H., Badji B., Sabaou N., Lebrihi A., Lefebvre G., Seguin E. and Tillequin F. (2002).** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233 - I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *J. Antibiot.*, 55 (8): 696-701.
- Lamari L., Zitouni A., Dob T., Sabaou N., Lebrihi A., Germain P., Seguin E. and Tillequin F. (2002).** New dithiopyrrolone antibiotics from *Saccharothrix* sp. SA 233. II. Physicochemical properties and structure elucidation. *J. Antibiot.*, 55 (8): 702-707.

## Références bibliographiques

---

- Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G., Marinelli F. (2000).** Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 79, 399–405.
- Lechevalier M.P. and Lechevalier H.A. (1970).** Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int.J. Syst. Bacteriol.*, 20,435-443
- Mba C.C. (1996).** Rock phosphate solubilizing *Streptosporangium* isolates from casts of tropical earthworm. *Resources, Conservation and Recycling.*, 17, 211-217.
- Meklat A., Bouras N., Zitouni A., Mathieu F., Lebrihi A., Schumann P., Spröer C., Klenk H. P. and Sabaou N. (2013).** Actinopolyspora mزابensis sp. nov., a halophilic actinomycete isolated from an Algerian Saharan soil. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology.*, 63, 3787–3792.
- Meklat A. (2012).** Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'*Actinopolyspora*. Thèse de Doctorat, E.N.S Kouba, Alger.
- Meklat A., Sabaou N., Zitouni A., Mathieu F. and Ahmed Lebrihi. (2011).** Isolation, taxonomy, and antagonistic properties of halophilic actinomycetes in saharan soils of Algeria. *Appl. Environ. Microbiol.*
- Messaoudi O. (2013).** Contribution à la caractérisation de souches d'actinomycètes productrices de métabolites antibactériens isolées de la sebkha de kenadsa (Béchar).Mémoire de Magister, Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen.
- Quintana, E. & Goodfellow, M. (2012).** Genus I. *Streptosporangium*. In Bergy's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd edn, vol. 5, pp. 1811–1825. Edited by W. B. Whitman, M. Goodfellow, P. Kämpfer, H.-J. Busse, M. E. Trujillo, W. Ludwig, K. Suzuki & A. Parte. New York: Springer.
- Sabaou N. (1988).** Contribution à l'étude des actinomycètes des sols des palmeraies algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat Es Sciences Naturelles, option Microbiologie, USTHB, Alger..
- Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. and Bounaga N. (1992).** Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can J Microbiol.*, 38:1066–1073.
- Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. and Bennadji H. (1998).** Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse.*, 9(2):147–153.
- Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012).** Biologically active secondary metabolites from actinomycetes. *Cent. Eur. J. Biol.*, 7, 373-390.
- Stackebrandt E., Kroppenstedt R.M., Jahnke K.D., Kemmerling C. and Gürtler H.. (1994).**

## Références bibliographiques

---

Transfer of *Streptosporangium viridogriseum* (Okuda et al. 1966), *Streptosporangium viridogriseum* subsp. *Kofuense* (Nonomura and Ohara 1969), and *Streptosporangium albidum* (Furumai et al. 1968) to *Kutzneria* gen. nov. as *Kutzneria viridogrisea* comb. nov., *Kutzneria kofuensis* comb. nov., and *Kutzneria albida* comb. nov., respectively, and emendation of the genus *Streptosporangium*. *Int. J. Syst. Bacteriol.*, 44: 265–269.

**Stamford T.L.M., Stamford N.P., Coelho L.C.B.B. and Araujo J.M. (2002).** Production and characterization of a thermostable glucoamylase from *Streptosporangium* sp. endophyte of maize leaves. *Bioresource Technol.*, 83, 105-109.

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

**Umezawa I., Komiyama K., Takeshima H., Awaya J. and Omura S. (1976).** A new antitumorantibiotic, PO-357. *J Antibiot.*, 29,1249–1251.

**Whitham, T.S., M. Athalye, D.E. Minnikin and M. Goodfellow. (1993).** Numerical and chemical classification of *Streptosporangium* and some related actinomycetes. *Antonie van Leeuwenhoek.*, 64: 387–429.

**Yekkour A. (2013).** Implication de quelques souches de *Streptomyces* antagonistes de *Fusarium culmorum* dans le biocontrôle de la fusariose de l'orge et effets de l'antibiotique sécrété par *Streptomyces* sp.WAB9 sur la survenue d'événements cellulaires liés à cette maladie. Thèse de Doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba, Alger. 162 p.

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

## TABLE DES MATIERES

	Page
REMERCIEMENT	
DEDICACES	
TABLE DES MATIERES	
RESUME	
ABSTRACT	
ملخص	
LISTE DES ABRÉVIATIONS	
LISTE DES FIGURES	
LISTE DES TABLEAUX	
INTRODUCTION	1
<b>PARTIE I: ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE</b>	
<b>I. TAXONOMIE DES ACTINOBACTÉRIES</b>	<b>3</b>
1. Définition et taxonomie générale des actinobactéries	3
2. Caractéristiques générales	3
3. Identification des actinobactéries	4
<b>II. Taxonomie des <i>Streptosporangiaceae</i> à sporange</b>	<b>5</b>
1. La famille des Streptosporangiaceae	5
2. Le genre <i>Streptosporangium</i>	5
2.1 Espèces appartenant au genre <i>Streptosporangium</i>	6
<b>III. ÉCOLOGIE DES ACTINOBACTÉRIES</b>	<b>8</b>
1. Distribution dans l'environnement	8
2. Distribution dans les sols sahariens algériens	9
<b>IV. IMPORTANCE DES ACTINOBACTÉRIES</b>	<b>9</b>
1. Importance dans le domaine agronomique	9
2. Importance dans le domaine médical et vétérinaire	9
3. Importance dans le domaine écologique	10



## Table des matières

---

4.Métabolites secondaires sécrétés par les espèces du genre <i>Streptosporangium</i>	11
<b>V. LES ANTIBIOTIQUES</b>	<b>12</b>
3. Antibiotiques antibactériens	12
3.1. Antibiotiques naturels	12
3.2 Antibiotiques de synthèse	12
4.Antibiotiques antifongiques	13
4.1 Antifongiques naturel	13
4.2 Antifongiques de synthèse	14
<b>PARTIE II: Matériel et méthodes</b>	<b>14</b>
<b>I. MATERIEL</b>	<b>14</b>
1. Souches d'actinobacteries et germes-cibles	14
1.1. Souches du genre <i>Streptosporangium</i>	14
1.2. Microorganismes-cibles	14
<b>II. METHODES</b>	<b>14</b>
1. Mise en évidence de l'activité antagoniste des souches du genre <i>Streptosporangium</i> sur milieu solide (cylindres d'agar)	14
1.1. Préparation et calibration des suspensions bactériennes	15
1.2. Préparation et calibration des suspensions fongiques	15
1.3. Test de l'activité antagoniste	16
2. Croissance et production des composés antibactériens en milieu liquide par les souches de <i>Streptosporangium</i>	16
2.1. Pré-cultures	16
2.2. suivi de la croissance et de production des composés antibactériens	16
2.2.1. Evolution de l'activité des composés antibactériens	17
3. Extraction des composés antibactériens et antibiographie	17
3.1. Extraction à partir des filtrats de culture	17
3.2. Extraction à partir du mycélium	17
3.3. Antibiographie	18
4. Purification des molécules antibactériennes par HPLC	

## Partie III: Résultats et discussion

	Page
<b>I. ETUDE DES PROPRIETES ANTAGONISTES DES SOUCHES DE GENRE STREPTOSPORANGIUM</b>	<b>20</b>
1. Mise en évidence de l'activité antagoniste en milieu solide	20
<b>II. PRODUCTION DE MOLECULES ANTIBACTERIENNES EN MILIEU LIQUIDE</b>	<b>22</b>
1. Cinétiques de production des composés antibactériens, de la souche <i>streptosporangium sp Sg20</i>	22
<b>III. EXTRACTION DES COMPOSES ANTIBACTERIENS ET ANTIBIOGRAPHIE</b>	<b>25</b>
1. Extraction des composés antibactériens par la souche <i>strptosporanguim sp Sg20</i> .	25
1.1. Extraction à partir du filtrat de culture de la souche Sg20	26
1.2. Extraction à partir du mycélium	26
<b>IV. PURIFICATION DE COMPOSES ANTIBACTERIENS DE LA SOUCHE <i>Streptosporangium sp (Sg20 )</i> PAR HPLC</b>	<b>27</b>
1. Analyse par HPLC des extraits organiques du filtrat de culture	27
2. Analyse par HPLC de l'extrait méthanolique du mycélium	28
<b>CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES</b>	<b>29</b>
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	
<b>ANNEXES</b>	

**ANNEXE N° 1**

**COMPOSITION DES MILIEUX DE CULTURE**

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

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

**Milieu ISP2 (International Streptomyces Project 2)** ([Shirling et Gottlieb, 1966](#))

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

**Gélose nutritive (GN)**

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