

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



Mémoire de fin d'étude

Présenté pour l'obtention du diplôme de Master en sciences de la nature et de la vie
OPTION : MICROBIOLOGIE

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

Présenté par :

MECHERI Sihem et SIFI Nour el houda

Optimisation de la production des molécules bioactives par une souche d'actinobactérie *Streptomyces* sp. PAL114

Soutenu le 17 / 09 / 2020

Devant le jury composé de :

Mme AIT SAADI N.

MCB USDB 1

Présidente

Mr GUETARNI D.

Professeur USDB 1

Examineur

Mme BOUBETRA D.

MCB USTHB

Promotrice

Année universitaire : 2019-2020

Remerciements

Tout d'abord, louange à « ALLAH » qui nous a guidé sur le droit chemin tout au long de ce travail et nous a inspiré les bons pas et les justes reflexes, sans sa miséricorde, ce travail n'aurait pas abouti.

Notre travail ne pourrait avoir de valeur sans la contribution des membres de jury qui ont accepté de juger ce mémoire.

Nous exprimons toutes nos gratitudes et nos remerciements aux membres de jury :
Madame AIT SAADI Nacera, Maitre de conférences à l'Université Saad Dahleb De Blida 1 pour l'honneur que vous nous avez fait, en acceptant de présider ce jury.
A Monsieur GUETARNI Djamel, Professeur à l'Université Saad Dahleb De Blida 1 pour nous avoir offert le privilège d'examiner ce travail.

Nous remercions Monsieur ZITOUNI, directeur du laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens de l'ENS de Kouba-Alger, pour la confiance qu'il nous a accordée en nous accueillant au sein de son laboratoire.

Nos remerciements les plus chaleureux vont directement vers notre promotrice, Madame BOUBETRA Dalila, pour nous avoir dirigé le long de l'élaboration de ce travail, pour la qualité de son encadrement et la pertinence de ses remarques, pour son extrême gentillesse, sa disponibilité et son aide. Veuillez trouver ici l'expression de notre respectueuse considération et notre profonde admiration pour toutes vos qualités scientifiques et humaines.

Nous remercions vivement Madame TATA Samira, qui était toujours à nos cotés pendant la période de stage, merci pour votre soutien, vos capacités scientifiques, vos précieux conseils, vos orientations et surtout vos échanges amicaux.

Par la même chaleur, nous remercions Madame MEKLAT Atika pour ses qualités scientifiques et humaines qui ont toujours été au service des autres, sans votre aide nous n'aurions pas pu réaliser notre stage de fin d'étude.

Nous exprimons nos plus vifs remerciements à Madame KACI Sonia, (ingénieure de LBSM), pour sa qualité humaine, sa gentillesse absolue et sa simplicité.

Par la même volonté, nous remercions toute l'équipe du laboratoire LBSM, toute notre reconnaissance pour eux pour l'expérience enrichissante et pleins d'intérêts qu'ils nous ont fait vivre durant la période de stage.

Un profond respect à tous nos professeurs qui nous ont enseignés durant notre cursus, à nos collègues et à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à la réalisation de ce mémoire.

Dédicaces

Je remercie Dieu le « Tout Puissant » pour m'avoir donné la force et le courage de surmonter tous les obstacles pour mener ce travail à terme.

Je dédie affectueusement ce modeste travail aux êtres qui me sont les plus chers,

A mes très chers et tendres parents qui m'ont arrosé d'amour et d'espoirs.

Quoi que je fasse ou je dise, je ne saurai exprimer ma reconnaissance, mon respect, mon amour et ma considération pour le soutien et les sacrifices que vous n'avez jamais cessé de consentir pour que je puisse atteindre mes objectifs.

Que ce modeste travail soit l'exaucement de vos prières tant formulées, le fruit de vos innombrables sacrifices, bien que je ne vous en acquitterai jamais assez.

Puisse Dieu le Tout Puissant vous accorde santé et longue vie.

A mes sœurs "Nesrine" et "Asmaa".

A mes frères "ChemsEddine" et "Aboubakre".

A mon cher neveu "AbdElJalil".

A mes grands parents « FatmaZohra » et « M'hamed ».

Aux grandes familles "MECHERI" et "KESSAR".

A mon binôme "NourElHouda", pour son soutien et sa compréhension tout au long de l'élaboration de ce mémoire.

A mes chères et adorables amies « Fella », « Fouzia », « Asma » et « Yasmine ».

À tous ceux qui m'ont apporté leur aide et leurs conseils, à tous ceux que j'aime.

Sihem

Dédicaces

Je dédie ce mémoire à :

A mes très chers parents, que Dieu le Tout-Puissant vous garde et vous procure la santé, le bonheur infini et une longue vie pour que vous demeuriez le flambeau illuminant pour nous.

Vous résumez si parfaitement le mot «parents » qu'il serait superflu d'y ajouter quelque chose...

A ma chère Maman MALIKA

Tous les mots du monde ne sauraient exprimer l'immense amour que je te porte, ni la profonde gratitude que je te témoigne pour tous les efforts et les sacrifices que tu n'as jamais cessé de consentir pour mon instruction et mon bien-être. Je vous remercie infiniment pour votre patience continue avec moi.

A mon cher Papa BOUALEM

Tu as été depuis ma plus tendre enfance, l'exemple à suivre. Ton soutien moral, tes encouragements m'ont poussé à achever mes ambitions et d'être ce que je suis. Sans toi et ton aide précieuse, ce travail n'aurait jamais vu la lumière surtout durant cette pandémie. Je te dédie ce travail en témoignage de mon amour, mon respect et ma reconnaissance.

À Mes Aimables Sœurs KHAOULA et ASMAA et mon petit frère ABED EL-SALEM

En souvenir d'une enfance dont nous avons partagé les meilleurs et les plus agréables moments. Pour toute la complicité et l'entente qui nous unissent. Je ne peux exprimer à travers ses lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers vous. Merci pour votre précieuse aide à la réalisation de ce travail. Puisse l'amour et la fraternité nous unissent à jamais. Que Dieu le Tout-Puissant vous protège et vous accorde la réussite dans vos vies, avec tout le bonheur qu'il faut pour vous combler.

À La Mémoire De Mes grands-parents paternelle

J'ai profondément souhaité que vous soyez présent parmi nous ce jour. Puisse vos âmes reposer en paix. Que Dieu, le tout puissant, vous couvre de sa sainte miséricorde et vous accueille au paradis.

À Mes Grands-parents Maternelle

Aucune dédicace ne saurait exprimer tout ce que je ressens pour vous. Je vous remercie pour tout le soutien exemplaire et l'amour exceptionnel que vous m'avez porté depuis mon enfance.

A toute la famille SIFI

A toute la famille TCHOUK

A ma Belle-famille

A mon fiancé BILLEL

Je souhaite que cette mémoire vous apporte la joie de voir aboutir vos espoirs et j'espère ne jamais vous décevoir.

A toutes mes chères amies CHAIMA, IMANE, SIHEM, AMIRA, SABRINA, SABAH, FAIZA, AHLEM...

A tous les inoubliables moments que nous avons passés ensemble. Avec vous j'avais appris le vrai sens de l'amitié, vous étiez toujours là pour me soutenir, m'épauler et me remonter le moral, nous avons partagé des moments de joie et de tristesse, d'épanouissement et de stress

et à chaque fois vous vous êtes montrées compréhensives et fidèles j'espère que vous trouverez dans ce travail tous l'amour et la reconnaissance que je vous dois.

A tous mes maitres de l'enseignement primaire, de l'enseignement secondaire, et de l'enseignement supérieur, en témoignage de mon affection et respect

A tous ceux qui me sont très chers et que j'ai omis de citer

Que dieu vous garde et vous accorde des jours meilleurs.

Je vous aime.

NOUR EL HOUDA

TABLE DES MATIERES

Liste des figures

Liste des tableaux

Liste des abréviations

RÉSUMÉ

SUMMARY

ملخص

Introduction.....1

Chapitre I

Synthèse bibliographique

I. LES ANTIBIOTIQUES3

1. Production d'antibiotiques.....3

1.1. Antibiotiques naturels4

1.1.1. Les actinomycètes4

1.1.2. Les bactéries non mycéliennes et les champignons4

1.2. Antibiotiques de synthèse.....5

2. Classification des antibiotiques.....6

2.1. D'après leur structure6

3. Mode d'action des antibiotiques7

3.1. Action sur la membrane plasmique7

3.2. Inhibition de la synthèse de la paroi8

3.3. Inhibition de la synthèse des protéines8

3.4. Action sur les acides nucléiques8

II. RECHERCHE DE NOUVELLES MOLÉCULES BIOACTIVES9

III. LES ACTINOMYCÈTES.....10

1. Ecologie des actinomycètes.....11

2. Importance des Actinobactéries mycéliennes11

2.1. Dans le domaine pharmaceutique et médical	11
2.2. Importance dans le domaine agronomique	12
2.3. Dans divers autres domaines.....	13
IV. LE GENRE <i>STREPTOMYCES</i> ET LA SOUCHE <i>STREPTOMYCES</i> SP. PAL114.....	13
1. Le genre <i>Streptomyces</i>	13
1.1. Taxonomie du genre <i>Streptomyces</i>	14
1.2. Métabolites secondaires sécrétés par les espèces de <i>Streptomyces</i>	16
2. La souche <i>Streptomyces</i> sp. PAL114	19
2.1. Origine et position taxonomique de <i>Streptomyces</i> sp. PAL114	19
2.2. Production d'antibiotiques.....	20
V. FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES.....	21
1. Facteurs nutritionnels	22
1.1. Source de carbone	22
1.2. Source d'azote.....	22
1.3. Sels et oligo-éléments	23
2. Les facteurs physico-chimiques	23
2.1. Effet du pH	23
2.2. Effet de la température	23
2.3. Effet de l'agitation.....	24
3. Inoculum.....	24
4. Effet du temps d'incubation.....	24

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. MICROORGANISMES.....	25
1. Souche <i>Streptomyces</i> sp. PAL 114	25
1.1. Origine	25
1.2. Conservation.....	25
2. Microorganismes-cibles et profils de résistance aux antibiotiques.....	25

II. ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. PAL 114 SUR MILIEU SOLIDE	26
1. Méthode des stries croisées sur milieu solide ISP2.....	26
III. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE EN MILIEU LIQUIDE.....	27
1. Solution minérale de base.....	27
2. Sources d'azote et de carbone utilisées	28
2.1. Sources de carbone	28
2.2. Sources d'azote	29
3. Pré-cultures	29
4. Cinétiques de production des antibiotiques en fonction des sources d'azote et de carbone.....	30
4.1. Suivi de l'évolution de l'activité antimicrobienne	31
4.2. Suivi de l'évolution de la biomasse	32
4.3. Suivi de l'évolution du pH.....	32
5. Extraction des antibiotiques.....	33
5.1. Extraction à partir du filtrat de culture	33
5.2. Extraction à partir du mycélium	33
6. Antibiographie.....	33

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE <i>STREPTOMYCES</i> SP. PAL 114 SUR MILIEU SOLIDE	35
1. Résultats.....	35
2. Discussion	36
II. CINÉTIQUES DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE PAL114 SUR MILIEUX LIQUIDES.....	36
1. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 en milieu liquide ISP2	37

1.1. Résultats.....	37
1.2. Discussion	40
2. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 sur milieu MS-DL-proline additionné de différentes sources de carbone	41
2.1. Résultats.....	41
2.1.1. Milieu MS + glucose	41
2.1.2. Milieu MS + maltose.....	41
2.1.3. Milieu MS + amidon.....	42
2.2. Discussion	44
3. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 sur milieu MS-Amidon additionné de différentes sources d'azotes	46
3.1. Résultats.....	46
3.1.1. Milieu MS + DL-Proline.....	46
3.1.2. Milieu MS + L-leucine.....	46
3.1.3. Milieu MS + DL-Tryptophane	46
3.2. Discussion	48
III. ACTIVITÉS DES EXTRAITS DES SURNAGEANTS DE CULTURE ET DE LA BIOMASSE MYCÉLIENNE	49
1. Résultats.....	49
1.1. Activités sur milieu ISP2 liquide.....	51
1.2. Activités sur milieu MS + DL-proline additionné de différentes sources de carbone	51
1.3. Activités sur milieu MS + Amidon additionné de différentes sources d'azote ...	51
2. Discussion	52

Conclusion

Références bibliographiques

Liste des figures

Figure 1. Groupes de microorganismes producteurs d'antibiotiques (Lazzarini <i>et al.</i> , 2001, in Tiwari et Gupta, 2011).....	5
Figure 2. Représentation schématique des mécanismes d'action des antibiotiques (Procopio <i>et al.</i> , 2012).....	9
Figure 3. Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> (Barka <i>et al.</i> , 1985).....	14
Figure 4. Types de chaînes de spores chez les espèces de <i>Streptomyces</i> (Manuel de Bergey, 2012).....	16
Figure 5. Morphologie de la surface des spores de quelques espèces de <i>Streptomyces</i> observée au microscope électronique à balayage (Prescott <i>et al.</i> , 2002).	16
Figure 6. Phases de croissance bactérienne et de production de métabolites (Harir <i>et al.</i> , 2018).....	17
Figure 7. Macromorphologie de la souche PAL114 poussant sur milieu ISP2 (Aouiche, 2011).....	19
Figure 8. Arbre phylogénétique basé sur l'analyse des séquences du gène codant pour l'ARNr 16S et montrant la relation entre la souche PAL114 et les souches-types des espèces les plus proches du genre <i>Streptomyces</i> (Aouiche, 2013).	20
Figure 9. Profil du chromatogramme de l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture de la souche PAL114 solubilisé dans du méthanol (Aouiche, 2013).	21
Figure 10. Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.	27
Figure 11. Schéma du protocole réalisé lors des cinétiques de production des antibiotiques sur milieux MS et ISP2, et mesure du poids sec et du pH.	31
Figure 12. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 et évolution du pH et de la biomasse en milieu liquide ISP2 (Tata, 2015).	38
Figure 13. Activité de la souche PAL114 contre <i>B. subtilis</i> ATCC 6633 (Bs à gauche) et <i>S. aureus</i> 639c (Sa à droite) par la méthode de diffusion des puits (Tata, 2015).	38
Figure 14. Cinétiques de l'évolution de la croissance, du pH et des activités antimicrobiennes de la souche PAL114 dans le milieu liquide ISP2, contre <i>Candida albicans</i> M3 (cercle rempli), <i>Aspergillus carbonarius</i> M333 (carré vide) et <i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633 (croix) (Aouiche, 2013).....	39
Figure 15. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes et évolution du pH et de la biomasse, en milieu liquide MS-DL-proline additionné de différentes sources de carbone (Tata, 2015).....	43

Figure 16. Cinétiques de production des antibiotiques antibactériens et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL114 cultivée dans le milieu MS-amidon additionné de différentes sources d'azote (Tata, 2015).....**47**

Liste des tableaux

Tableau 1. Classification des antibiotiques d'après leur structure chimique (Berdy <i>et al.</i> , 1987; Berdy, 2005).....	6
Tableau 2. Exemples de molécules bioactives produites par les <i>Streptomyces</i>	18
Tableau 3. Activité antimicrobienne de la souche PAL114 sur milieu solide ISP2 par la technique des stries croisées (zones d'inhibition en mm) (Aouiche, 2013).	20
Tableau 4. Les profils de résistance aux antibiotiques de certains germes-cibles.	26
Tableau 5. Les concentrations de différentes sources de carbone testées par Ababutain <i>et al.</i> (2013).....	29
Tableau 6. Calibrage des suspensions des germes-cibles (Eucast, 2013).	31
Tableau 7. Activité antimicrobienne de la souche PAL114 sur milieu solide ISP2.	35
Tableau 8. L'effet des différentes sources de carbone sur le poids sec et la productivité de l'agent antimicrobien par <i>Streptomyces</i> sp. MS-266 Dm4 contre <i>B. cereus</i> (Ababutain <i>et al.</i> , 2013).....	44
Tableau 9. Activités antimicrobiennes des extraits organiques du filtrat de culture de la souche PAL114. (Aouiche, 2013).	50
Tableau 10. Activités antibactériennes des extraits organiques du surnageant de culture et de la biomasse de la souche PAL114 ayant poussé sur différents milieux de culture (Tata, 2019).	52

Liste des abréviations

ADN Acide désoxyribonucléique

ARNr 16S Acide ribonucléique codant pour la sous unité ribosomique 16S

ATCC American Type Culture Collection

Bs *Bacillus subtilis*

DO Densité optique

ISP2 International *Streptomyces* Project 2 (milieu de culture)

MRSA Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

MS Milieu de culture synthétique

S.a *Staphylococcus aureus*

RÉSUMÉ

Streptomyces sp. PAL114 est une souche d'actinobactérie isolée d'un sol saharien de la région de Mezab à Ghardaïa., Des travaux antérieurs dans le laboratoire LBSM à l'ENS de Kouba ont montré que cette souche est productrice d'antibiotiques antibactériens et/ou antifongiques dans le milieu de culture ISP2. Ces résultats intéressants nous ont encouragés à poursuivre les travaux sur cette actinobactérie, dans le but d'optimiser et d'augmenter la production des molécules bioactives.

L'évaluation du potentiel antagoniste de l'isolat PAL114 vis-à-vis des microorganismes cibles à Gram positif et à Gram négatif a montré une activité forte contre *Micrococcus luteus* ATCC 9314, modérée, faible ou nulle contre les autres bactéries testées.

L'étude de l'effet des différents constituants du milieu de culture sur la production d'agents antibactériens par la PAL114 a été réalisée en milieu synthétique contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c résistant à la méthicilline, et *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

L'effet des différents constituants du milieu de culture sur la production d'agents antibactériens par la PAL114 a été étudié et comparé à celui d'autres souches de *Streptomyces* ; *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 et trois autres souches isolées d'un sol amazonien. L'effet des sources de carbone ; amidon, glucose et maltose est étudié dans le milieu MS additionné de D-L proline comme source d'azote. Ce même milieu de base MS additionné de la meilleure source de carbone est utilisé pour tester différentes sources d'azote englobant, la D-L proline, la L-leucine et le L-tryptophane. Les résultats obtenus ont montré que la production est meilleure dans le MS additionné d'amidon, comme source de carbone, chez la PAL 114 ainsi que chez la souche *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 contre *Bacillus cereus*. Par contre la D-L proline s'est avérée être la meilleur source d'azote pour la production d'antibiotique pour la PAL 114 mais pas pour les trois souches de *Streptomyces* spp isolées du sol amazonien.

De bonnes activités antibactériennes se sont montrées dans la phase organique de l'extrait au dichlorométhane de la souche PAL114 poussant sur milieu ISP2 et sur milieu MS additionnés des différentes sources de carbone et d'azote à l'exception de celui additionné de L-tryptophane. Seuls les extraits méthanoliques mycéliens issus du milieu ISP2 et ceux issus du milieu MS-amidon + L-tryptophane qui ont montré des activités antimicrobiennes contre les microorganismes testés.

Mots clés : *Streptomyces* sp. PAL114, molécules bioactives, sources de carbone, sources d'azote, activités antibactériennes.

SUMMARY

Streptomyces sp. PAL114 is an actinobacterial strain isolated from Saharan soil in the Mezab region of Ghardaïa. Previous work in the LBSM laboratory at the ENS of Kouba has shown that this strain is a producer of antibacterial and/or antifungal antibiotics in the ISP2 culture medium. These interesting results encouraged us to continue the work on this actinobacteria, in order to optimize and increase the production of bioactive molecules.

The evaluation of the antagonistic potential of PAL114 isolate to the Gram-positive and Gram-negative target microorganisms showed high activity against *Micrococcus luteus* ATCC 9314, moderate, low or no activity against the other bacteria tested.

The study of the effect of the different constituents of the culture medium on the production of antibacterial agents by PAL114 was carried out in synthetic medium against *Staphylococcus aureus* MRSA 639c resistant to methicillin, and *Bacillus subtilis* ATCC 6633.

The effect of different constituents of the culture medium on the production of antibacterial agents by PAL114 was studied and compared to other strains of *Streptomyces*; *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 and three other strains isolated from Amazonian soil. The effect of carbon sources; starch, glucose and maltose is studied in the MS medium with D-L proline as a source of nitrogen. This same MS base medium with the best carbon source is used to test different nitrogen sources encompassing D-L proline, L-leucine and L-tryptophan. The results obtained showed that the production is better in starch-added DM as a carbon source in PAL 114 and in *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 against *Bacillus cereus*. On the other hand, D-L proline proved to be the best source of nitrogen for antibiotic production for PAL 114 but not for the three strains of *Streptomyces* spp isolated from Amazonian soil.

Good antibacterial activities were observed in the organic phase of the dichloromethane extract of strain PAL114 growing on ISP2 and MS media with the addition of different sources of carbon and nitrogen with the exception of L-tryptophan. Only methanolic mycelial extracts from the ISP2 medium and those from the MS-amidon + L-tryptophan medium which showed antimicrobial activities against the microorganisms tested.

Keywords: *Streptomyces* sp. PAL114, bioactive molecules, carbon sources, nitrogen sources, antibacterial activities.

ملخص

Streptomyces sp PAL 114 هي سلالة أكتينوبكتيريا معزولة من التربة الصحراوية في منطقة مزاب بولاية غرداية، وقد أظهرت اعمال سابقة في مختبر LBSM في المدرسة العليا للاساتذة أن هذه السلالة منتجة للمضادات الحيوية المضادة للبكتيريا و/أو مضادات الفطريات في الوسط ISP2. وقد شجعنا هذا البحث المثير للاهتمام على مواصلة العمل في هذا المجال من أجل تحسين وزيادة إنتاج الجزيئات النشطة أحياناً.

أظهر تقييم القدرة العدائية ل PAL 114 ضد الكائنات الدقيقة المستهدفة من ال Gram الموجب والGram السالب نشاطاً عالياً ضد (*Micrococcus luteus* ATCC 9314)، متوسطاً، منخفضاً أو منعهداً ضد البكتيريا الأخرى التي تم اختبارها.

أجريت دراسة تأثير المصادر الغذائية المختلفة للوسط على إنتاج المواد المضادة للبكتيريا بواسطة PA 114 في وسط اصطناعي ضد *Staphylococcus aureus* MRSA 639c المقاومة للميتيسيلين، و *Bacillus subtilis* ATCC 6633. وقد درس تأثير مختلف مكونات الوسط على إنتاج المواد المضادة للبكتيريا بواسطة PAL 114 وتمت مقارنة النتائج بالسلالات الأخرى من ال *Streptomyces*؛ *Streptomyces sp* MS-266 Dm 4 وثلاث سلالات أخرى معزولة من التربة الأمازونية. وقد تمت دراسة تأثير النشاء؛ الجلوكوز والمالتوز كمصدر للكربون في الوسط MS مضاف إليه البرولين D-L كمصدر للنيتروجين. هذا الوسط MS نفسه استعمل كوسط مع أفضل مصدر للكربون لاختبار مختلف مصادر النيتروجين بما في ذلك DL-برولين، L-ليوسين و L- تريبتوفان. أظهرت النتائج التي تم الحصول عليها أن الإنتاج كان أفضل في MS بإضافة النشاء كمصدر للكربون في PAL114 وفي *Streptomyces sp*. MS-266 4Dm ضد *Bacillus cereus*. أما من ناحية أخرى، ثبت أن D-L برولين هو أفضل مصدر للنيتروجين من أجل إنتاج المضادات الحيوية بالنسبة ل PAL114 ولكن ليس بالنسبة للسلالات الثلاث من *Streptomyces* المعزولة عن التربة الأمازونية.

لوحظ وجود أنشطة جيدة مضادة للبكتيريا في المرحلة العضوية من استخراج ثنائي الكلوروميثان من السلالة PAL 114 الذي تنمو على ISP2 ووسائط MS مع إضافة مصادر مختلفة للكربون والنيتروجين باستثناء التريبتوفان. فقط المستخلصات الميسيليلية الميثانولية من وسط ISP2 وتلك من MS-amidon + L-tryptophan التي أظهرت أنشطة مضادات الميكروبات ضد الكائنات الدقيقة التي تم اختبارها.

الكلمات المفتاحية: *Streptomyces* PAL114، جزيئات حيوية نشطة، مصادر الكربون، مصادر النيتروجين، أنشطة مضادة للبكتيري

Introduction

Les antibiotiques sont des molécules capables d'inhiber spécifiquement à de faible concentration la croissance de certains microorganismes ou de les détruire, ils peuvent être d'origine naturels, synthétiques ou semi- synthétiques.

Cependant, l'utilisation excessive de ces molécules a malheureusement très vite entraîné l'apparition de souches microbiennes résistantes, un phénomène qui ne cesse de s'accroître et constitue une préoccupation mondiale, incitant ainsi la poursuite des recherches de nouveaux antibiotiques plus efficaces. Face à ces besoins, il est donc essentiel de perpétuer la recherche sur les molécules naturelles à propriétés antibiotiques (parallèlement aux développements de nouvelles molécules de synthèse) dans l'espoir de trouver de nouveaux composés efficaces et moins toxiques afin de poursuivre la lutte contre les microorganismes pathogènes.

Les actinobactéries sont particulièrement très intéressantes par leur très grande faculté à produire différents composés à intérêt pharmaceutique, tels que les antibactériens, les antifongiques, les antiviraux, les antiparasitaires et les antitumoraux, mais aussi, les vitamines, les enzymes, les immunostimulants, les antihistaminiques, les vasodilatateurs, etc. Ces microorganismes présentent également un intérêt dans différents autres domaines (biotechnologie industrielle, agronomie, environnement, etc.) (Valan Arasu *et al.*, 2008; Jose et Jebakumar, 2013).

Le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine le plus au sein des actinobactéries. Il est le plus exploité pour ses nombreuses propriétés antagonistes et continue d'attirer l'intérêt de nombreux laboratoires dans le monde en raison de son métabolisme secondaire. Il est considéré comme étant le plus grand producteur de molécules antibiotiques. En effet, environ 80% des antibiotiques d'origine actinomycétale sont produits par les espèces de ce genre (Demain, 2006; Jose *et al.*, 2011).

Pour notre part, nous nous sommes intéressés à l'étude d'une souche d'actinobactérie (PAL114) qui a été isolée par Aouiche (2011) à partir d'un sol de la palmeraie d'Ahbès (région du Mزاب). Les études taxonomiques basées sur les critères morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires ont montré que cette souche appartient au genre *Streptomyces* et qu'elle est proche de l'espèce *S. griseoflavus* (Aouiche, 2013). La souche PAL114 a montré des activités antimicrobiennes intéressantes. Elle produit sur milieu

organique complexe ISP2 des antibiotiques qui ont été identifiés à la chaetoglobosine A, aux saquayamicines A et C et à la vinéomycine A1 (Aouiche, 2013).

L'objectif de ce travail est d'étudier l'influence des sources de carbone et d'azote sur la production d'antibiotiques par cette souche sur milieu synthétique.

Ce travail comprend trois parties :

- La première partie est consacrée à une présentation bibliographique sur les antibiotiques et leur mode d'action, les actinobactéries en général, le genre *Streptomyces* et la souche PAL114 en particulier, ainsi que les facteurs de culture pouvant influencer la production des antibiotiques.
- La deuxième partie fait trait à la description du matériel et des méthodes utilisées lors de la réalisation de ce travail.
- La troisième partie est réservée à la présentation des résultats obtenus par des travaux antérieurs et à leur discussion. Ces résultats concernent les propriétés antagonistes de la souche PAL114, les cinétiques de production d'antibiotiques sur milieu ISP2 et sur milieu synthétique en faisant varier les sources de carbone et d'azote sur ce dernier milieu.
- Une conclusion finale et des perspectives ont aussi été énoncées à la fin de ce travail.

Chapitre I
Synthèse bibliographique

I. LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des molécules organiques synthétisées par des microorganismes (aujourd'hui, définition étendue aux molécules de synthèse) qui en solution à faible dose inhibent la croissance d'autres microorganismes ou les détruisent (Bougnicourt, 1995).

En effet, la période des antibiotiques a commencé en 1929 avec la découverte de la pénicilline G provenant d'un champignon, *Penicillium notatum*. La production commerciale de la pénicilline G a prospéré dans les années 40. Durant ces années, Waksman et Woodruff (1940) ont découvert le premier antibiotique dérivé d'une culture d'actinobactérie à partir de l'espèce *Actinomyces* (actuellement *Streptomyces*) *antibioticus*. Cet antibiotique, nommé actinomycine D, est très actif contre les bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Il s'est avéré extrêmement toxique pour les animaux de laboratoire (Waksman et Woodruff, 1940). En 1943, Schatz *et al.* ont isolé deux souches de *Streptomyces griseus* qui produisent la streptomycine ; c'était le premier traitement chimiothérapeutique efficace contre la tuberculose ainsi qu'une multitude d'autres maladies (fièvre typhoïde, choléra, peste bubonique, tularémie, infections des voies urinaires, etc.) (Schatz *et al.*, 1944; Waksman, 1953). Depuis ces découvertes, les actinobactéries sont devenues l'objet de nombreuses recherches, notamment pour leur capacité à produire de nombreux composés bioactifs (Manivasagan *et al.*, 2013; Anandan *et al.*, 2016).

Les antibiotiques sont des produits du métabolisme bactérien et fongique. Ils sont produits essentiellement juste après la phase de croissance. Les antibiotiques peuvent agir sur la croissance des germes, interférer avec leur métabolisme énergétique ou inhiber la biosynthèse des composants cellulaires.

Un antibiotique est caractérisé par son spectre d'action, c'est-à-dire l'éventail des agents pathogènes sensibles à son action. Le spectre est directement lié à la structure chimique de l'antibiotique et à la cible microbienne.

1. Production d'antibiotiques

Les antibiotiques sont des métabolites secondaires (appelés aussi idiolites), généralement synthétisés à la fin de la phase exponentielle (trophophase) et au début de la phase stationnaire (idiophase) (Harir *et al.*, 2018). La production des métabolites secondaires regroupe les voies de synthèse des composés qui n'ont pas de fonction apparente dans le métabolisme cellulaire.

Elle n'est pas liée aux besoins de croissance ni aux besoins énergétiques des organismes producteurs (Hodgson, 2000; Delaunay *et al.*, 2003; Nithya *et al.*, 2018).

1.1. Antibiotiques naturels

La grande majorité des antibiotiques est produite par des microorganismes. Signalons cependant, l'intérêt qu'offrent les plantes supérieures dans cette production. Parmi les microorganismes, les bactéries (y compris les actinomycètes) sont responsables d'environ 74% de la production, et les champignons de 22% (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011).

1.1.1. Les actinomycètes

Actuellement, la majeure partie des antibiotiques produits industriellement (environ 90%) sont sécrétés par les actinomycètes. Les deux tiers de toutes les substances bioactives d'origine microbienne connues sont produites par ces derniers (Hamaki *et al.*, 2005). Dans ce groupe bactérien, le genre *Streptomyces* produit à lui seul environ 46% des antibiotiques parmi les 8000 produits antimicrobiens décrits (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011) (figure 1) et plusieurs sont commercialisés, à savoir, la streptomycine, la kanamycine, l'oxytétracycline, le chloramphénicol, l'érythromycine, la néomycine, la novobiocine et la nystatine.

De nombreuses recherches se sont récemment développées en vue de trouver de nouveaux antibiotiques produits par des actinomycètes appelés « rares ». Ceux-ci sont à l'origine d'environ 11% des antibiotiques d'origine microbienne.

Parmi les molécules élaborées par les actinomycètes, seules 20% sont des antifongiques, les 80% restantes ont des activités biologiques diverses: antibactériennes (surtout), antivirales, antitumorales, antiprotozoaires, insecticides, etc.

1.1.2. Les bactéries non mycéliennes et les champignons

En dehors des actinomycètes, les bactéries non mycéliennes produisent environ 17% des antibiotiques d'origine microbienne (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011), et qui sont sécrétés surtout par les bactéries du genre *Bacillus* et *Pseudomonas*. D'autres bactéries appartenant à des genres très divers tels que *Micrococcus*, *Chromobacterium*, *Proteus*, etc., produisent également quelques antibiotiques (Breton *et al.*, 1989).

Parmi les champignons producteurs, nous citerons les genres *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichoderma* et *Coleophoma* (champignons imparfaits, ascomycètes) et aussi certains basidiomycètes et zygomycètes (Laskin et Lechevalier, 1984; Barrett, 2002). Les

antibiotiques sécrétés les plus connus sont la pénicilline, la céphalosporine, l'acide fusidique et la griséofulvine.

En fait, le nombre d'antibiotiques commercialisés d'origine fongique est faible, les plus importants étant les β -lactamines (pénicillines et céphalosporines).

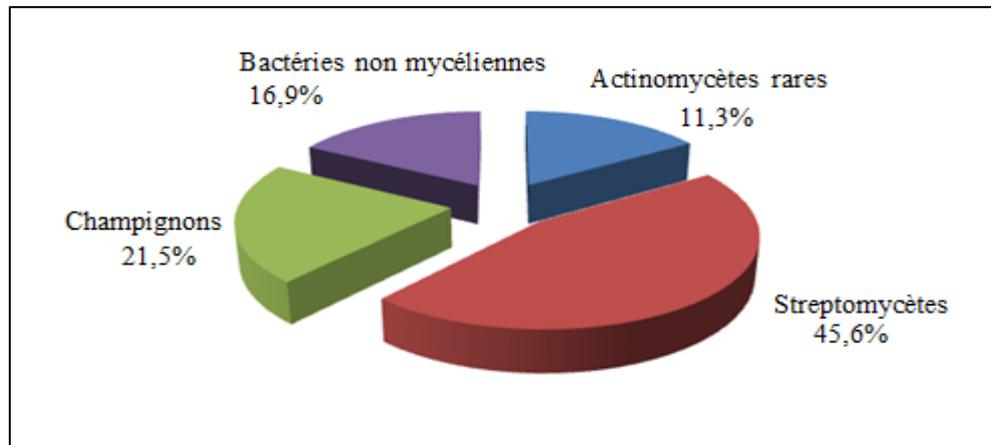


Figure 1. Groupes de microorganismes producteurs d'antibiotiques (Lazzarini *et al.*, 2001, *in* Tiwari et Gupta, 2011).

1.2. Antibiotiques de synthèse

Entre 1932 et 1935, Gerhard Domagk découvrit, en cherchant des substances chimiques toxiques pour les bactéries, que le sulfamidochrysoïdine (dérivé soufré de l'acide para-aminobenzoïque) est doté d'une activité antimicrobienne. Cette découverte a permis l'utilisation des sulfamides en chimiothérapie anti-infectieuse (Moulin et Coquerel, 1998). Par la suite, il y a eu synthèse d'autres agents antibactériens, à savoir les 5-nitrohétérocycles comprenant le 5-nitrofuryle (1944), les 5-nitroimidazoles dont le métronidazole (1959), l'éthionamide (1956), le triméthoprim (1957), les pénèmes (1977), l'acide nalidixique (1962) et les fluoroquinolones à la fin des années 1970 (Bergogne-Berezi et Dellamonica, 1999). De nombreux antibiotiques ont été fabriqués industriellement par hémisynthèse à partir d'un substrat commun, l'acide 6-aminopénicillanique, composé naturel sécrété par *Penicillium chrysogenum*. A partir de ce composé, plusieurs pénicillines ont été obtenues par hémisynthèse, comme la méticilline et l'oxacilline qui résistent à l'action de la pénicillinase (Demain, 1999).

2. Classification des antibiotiques

Les antibiotiques peuvent être classés en se basant sur plusieurs critères: leur structure chimique, leur spectre d'action, leur activité, leur origine et leur charge électrique. La classification basée sur la structure chimique est la plus utilisée (Berdy *et al.*, 1987; Yala *et al.*, 2001). Les molécules présentant des caractères voisins, voire presque identiques, sont groupées en familles, sous familles et groupes (Berdy *et al.*, 1987; Berdy, 2005).

2.1. D'après leur structure

La classification la plus utilisée en recherche fondamentale est celle de Berdy *et al.* (1987) et Berdy (2005). Cette classification a permis de classer près de 7000 molécules en 9 grandes familles et de nombreuses sous familles chimiques (tableau 1). Cette classification repose sur la nature chimique des antibiotiques en mettant à l'écart tout intérêt thérapeutique et clinique. Mais d'autres classifications utilisées dans le domaine médical existent.

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

Familles	Principales sous familles	Exemples d'antibiotiques
Antibiotiques contenant des glucides	- Glucides purs - Aminoglycosides - Glycopeptides	- Nojirimycine - Streptomycine, gentamicine, kanamycine - Vancomycine, risotocétine
Lactones macrocycliques	- Macrolides - Polyènes - Macrolactames	- Erythromycine, spiramycine - Nystatine, amphotéricine - Maytansine
Quinones et antibiotiques apparentés	- Composés polycycliques linéairement accolés - Anthraquinones - Naphtoquinones - Benzoquinones	- Tétracyclines - Anthracyclines - Rubomycine - Mitomycine, saframycine
Acides aminés et peptides	- Dérivés d'acides aminés - Homopeptides - Peptides - Lipopeptides	- Pénicilline, cyclosérine - Bacitracine - Valinomycine - Polymyxines

Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'azote	- Hétérocycles non accolés - Hétérocycles accolés	- Mildiomycine - Phénazines
Antibiotiques hétérocycliques contenant de l'oxygène	- Dérivés du furane - Polyéthers	- Monensine
Antibiotiques aromatiques	- Composés benzéniques - Composés aromatiques accolés - Autres dérivés	- Chloramphénicol - Griséofulvine - Novobiocine
Antibiotiques alicycliques	- Dérivés du cyclo-alcane - Terpènes - Oligoterpènes	- Cycloheximide - Acide marasmique - Acide fusidique
Antibiotiques aliphatiques	- Dérivés d'alcane - Dérivés des acides carboxyliques aliphatiques - Composés contenant du phosphore	- Elaiomycine - Cérulénine - Fosfomycine

3. Mode d'action des antibiotiques

Le site d'action des antibiotiques dans la cellule microbienne peut être la membrane plasmique, la paroi cellulaire, les ribosomes, les acides nucléiques, etc. (Asselineau et zalta, 1973; Deacon, 1984).

3.1. Action sur la membrane plasmique

Les polyènes (amphotéricine B, nystatine) sont des antifongiques caractérisés par la présence d'un grand cycle lactone (comprenant 12 à 37 atomes de carbones). Ils agissent sur les stérols de la membrane plasmique des cellules eucaryotes (champignons, animaux), ce qui entraîne une diminution de la perméabilité membranaire et la mort des cellules. D'autres antibiotiques, tels que les polypeptides, agissent également sur la membrane plasmique bactérienne en se fixant sur les phospholipides (polymyxines) ou en se comportant comme des ionophores (gramicidines).

3.2. Inhibition de la synthèse de la paroi

Parmi les antibiotiques qui inhibent la synthèse de la paroi cellulaire, nous citons les β -lactamines, la cyclosérine, la fosfomycine, etc. Ils empêchent l'intégration des acides aminés formant le térapeptide muréique ou en empêchant celui-ci de se coller à la muréine.

3.3. Inhibition de la synthèse des protéines

Certains antibiotiques antibactériens peuvent se fixer sur les sous-unités ribosomiques 30S ou 50S (ex.: tétracyclines, macrolides et chloramphénicol), empêchant respectivement la fixation de l'ARN transférase porteur d'acides aminés, la translocation et la transpeptidation. Chez les eucaryotes, la synthèse des chaînes polypeptidiques est inhibée par la fixation de la kasugamycine sur la sous-unité 40S des ribosomes. La translocation des ribosomes sur l'ARN messenger est bloquée par le cycloheximide qui se fixe sur la sous-unité ribosomique 60S. La synthèse des protéines est aussi inhibée par la blasticidine S qui bloque l'incorporation des acides aminés.

3.4. Action sur les acides nucléiques

Certains antibiotiques tels que la mitomycine et l'acide nalidixique empêchent respectivement la réplication de l'ADN (en se fixant sur les deux brins d'ADN) et sa synthèse (par inhibition de l'incorporation de la thymine). L'actinomycine empêche la transcription de l'ADN en ARN messenger.

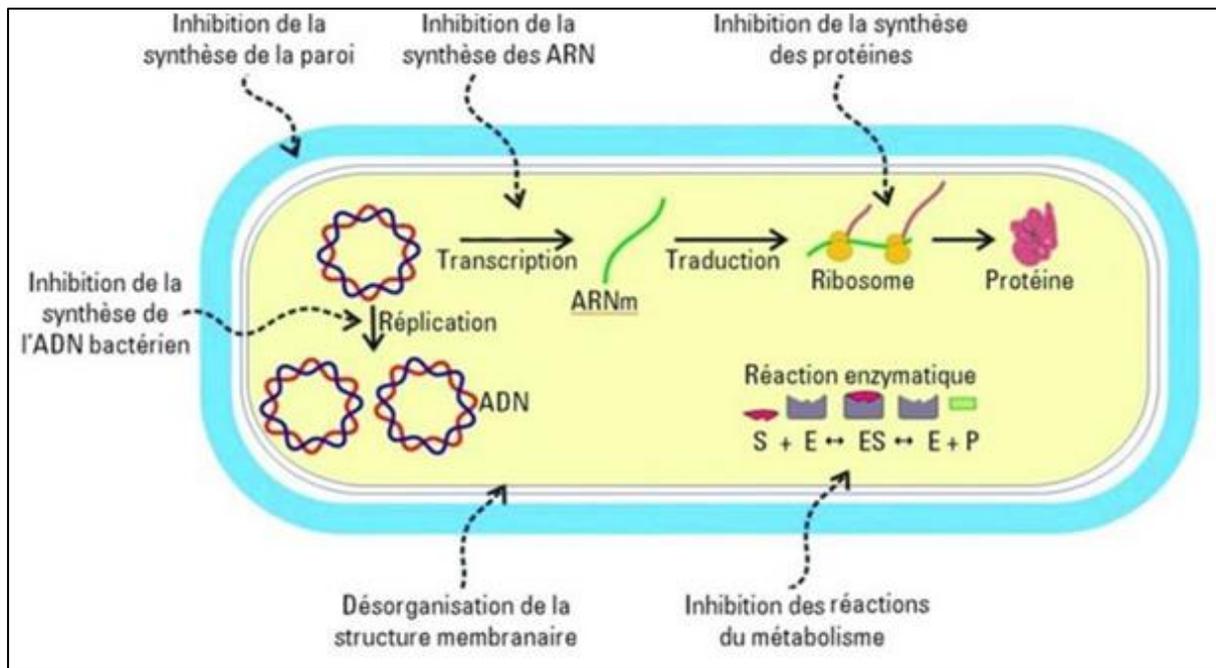


Figure 2. Représentation schématique des mécanismes d'action des antibiotiques (Procopio *et al.*, 2012).

II. RECHERCHE DE NOUVELLES MOLÉCULES BIOACTIVES

Devant l'émergence de la résistance bactérienne aux antibiotiques, il est nécessaire de développer constamment de nouvelles molécules bioactives. Ces dernières années, les recherches sont orientées vers la production de nouvelles molécules bioactives capables d'agir par de nouveaux mécanismes d'action, et ce, en vue de développer des agents susceptibles d'inhiber les mécanismes de résistance ou d'interférer avec la virulence bactérienne (Collignon *et al.*, 2016; Nithya *et al.*, 2018). Au lieu de tuer les bactéries, ces nouvelles molécules atténueraient leur pouvoir pathogène en ciblant leurs gènes de résistance et/ou leurs facteurs de virulence, ou encore en entravant la communication intercellulaire. Elles devraient également empêcher les bactéries de s'adapter à leur environnement sans porter atteinte à leur survie, réduire leur pathogénicité de résistance et restaurer l'activité des antibiotiques conventionnels devenus aujourd'hui inefficaces (Batraud, 2017).

Les microorganismes, les plantes et les animaux représentent des sources importantes de molécules bioactives. En ce qui concerne les microorganismes, ceux qui sont relativement rares dans le monde et provenant des milieux extrêmes sont très recherchés pour fournir des molécules originales issues de métabolismes nouveaux. Des méthodes ont été spécialement développées pour isoler ce type de microorganismes (Otoguro *et al.*, 2009; Tiwari et Gupta, 2011; Jose et Jebakumar, 2013; Kemung *et al.*, 2018). De plus, l'introduction des techniques

génétiques dans la recherche de nouveaux antibiotiques (fusion des protoplastes, recombinaison génétiques, etc.) a permis d'obtenir de nombreuses molécules nouvelles, antibactériennes et antifongiques (Cattoir et Daurel, 2009; Adrio et Demain, 2010; Zheng *et al.*, 2019). En outre, la recherche d'antibiotiques actifs sur des cibles spécifiques absentes chez l'homme permet la production de nouvelles molécules bioactives intéressantes (Mallié et Bastide, 2001; Mora-duarate *et al.*, 2002). A ceci s'ajoute la recherche de nouvelles molécules par synthèse chimique ou par hémisynthèse (Barrett *et al.*, 2001; Gupte *et al.*, 2002), ainsi que la recherche de nouvelles formulations d'antibiotiques permettant une meilleure diffusion de l'antibiotique *in vivo* (la faible solubilité de certains antibiotiques étant parmi les problèmes rencontrés en antibiothérapie). Actuellement, plusieurs stratégies sont développées dans le but de trouver des molécules bioactives originales et intéressantes dans différentes applications (pharmaceutique, biotechnologie industrielle, agronomie, etc.) (Singh *et al.*, 2019). La recherche de nouvelles molécules bioactives est donc indispensable et doit être poursuivie de manière perpétuelle (Hug *et al.*, 2018).

III. LES ACTINOMYCÈTES

Les actinomycètes sont classés dans le Règne des *Procaryotes*, la Division des *Firmicutes*, la Classe des *Thallobacteria* et l'Ordre des *Actinomycetales*. Cet Ordre est défini dans le Manuel de Systématique de Bergey de 1994 comme regroupant des bactéries à Gram positif ayant un pourcentage en guanine plus cytosine (G + C) supérieur à 55%. Il comprend des genres d'une grande variabilité morphologique, allant du cocci (*Micrococcus*) à un cycle bâtonnet-cocci (*Arthrobacter*) en passant par ceux formant des hyphes qui se fragmentent (*Nocardia*, *Rhodococcus*, *Saccharothrix*) et ceux qui possèdent un mycélium bien différencié et persistant (*Streptomyces*, *Actinomadura*, *Streptosporangium*).

Dans le Bergey's Manual de 2012, la définition des actinomycètes est restée la même (bactéries à Gram positif ayant un G+C supérieur à 55% et présentant une grande variabilité morphologique, la plupart étant mycéliens). Mais sur la base des données de la biologie moléculaire (notamment le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S), ces microorganismes sont classés actuellement dans le règne des *Procaryotae*, le phylum des *Actinobacteria* et la classe des *Actinobacteria* également.

Les *Actinobacteria* sont classées, depuis 2012, dans 15 ordres, 43 familles et 203 genres (Goodfellow *et al.*, in Bergey's Manual, 2012).

1. Ecologie des actinomycètes

Les actinomycètes sont répandus à l'échelle universelle et dans tous les substrats naturels (Tiwari et Gupta, 2013). Ils sont isolés à partir des sols (cultivés, désertiques, salés, etc.), des eaux (océans, mers, lacs, rivières, sources), de l'air, des glaciers et des sites pollués par des hydrocarbures ou par des métaux lourds (Lechevalier, 1981; Moncheva *et al.*, 2002; Okoro et Brown *et al.*, 2009; Zhang *et al.*, 2012; Jiang *et al.*, 2013). Ils sont présents au niveau des débris végétaux, ainsi qu'à l'intérieur des plantes en tant que symbiotes (Normand *et al.*, 2007; Janso et Carter, 2010; Zhao *et al.*, 2011). Ils sont également retrouvés dans les sources thermales (Barabote *et al.*, 2009) et même sur les surfaces gamma-irradiées (Phillips *et al.*, 2002). Il faut cependant signaler que c'est le sol qui abonde le plus en actinomycètes. Parmi les actinomycètes telluriques, le genre *Streptomyces* est celui qui prédomine le plus avec un pourcentage compris entre 80 et 95% (Williams, 1978). Par ailleurs, les genres *Actinoplanes* et *Micromonospora* prédominent nettement dans les sols gorgés d'eau et sont très fréquents dans les lacs, les rivières et les ruisseaux (Goodfellow *et al.*, 1990). En Algérie, les sols sahariens se sont révélés être relativement assez riches en actinomycètes, aussi bien du point de vue quantitatif que qualitatif (Sabaou *et al.*, 1980, 1992 et 1998). Ces microorganismes sont en majorité saprophytes, mais quelques formes sont pathogènes pour l'Homme, les plantes ou les animaux (Goodfellow et Williams, 1983; Castillo *et al.*, 2002).

2. Importance des Actinobactéries mycéliennes

Les Actinobactéries mycéliennes sont très utiles dans le domaine médical, pharmaceutique, agronomique et de nombreux autres domaines. Leur hétérogénéité métabolique et leur diversité écologique assez exceptionnelles font d'elles des producteurs potentiels de nombreuses molécules à propriétés très diverses et intéressantes (Anandan *et al.*, 2016). Il existe 23 000 métabolites secondaires produits par les microorganismes, dont 10 000 sont produits par les actinobactéries mycéliennes, ce qui représente 45 % du total des métabolites microbiens, et même 80 %, si on ne considère que les composés ayant un usage pratique (Bérdy, 2005).

2.1. Dans le domaine pharmaceutique et médical

Les actinomycètes sont les plus grands producteurs des composés actifs tels que les antiviraux, les antiparasitaires, les immunostimulants, les immunosuppresseurs, les enzymes, les vitamines, etc. Cependant, ils sont surtout réputés pour la production d'antibiotiques (Räty

et al., 2002; Takahashi et Omura, 2003; Solanki et kahana, 2008). En effet, plus de 45% des molécules bioactives d'origine microbienne sont produits par les actinomycètes (Solecka *et al.*, 2012). Parmi ces molécules, environ 80% sont produites par les espèces du genre *Streptomyces*, le genre le plus répandu dans l'environnement (Bull et Stach, 2005; Mohamed et Galal, 2005; Jose *et al.*, 2011).

Les antibiotiques sécrétés par ce genre (plusieurs centaines) peuvent être à activités antibactériennes et/ou antifongiques (aminoglycosides, aromatiques, glycopeptides, macrolides, polyènes, etc.), ou encore, avoir des propriétés antitumorales et cytostatiques (adriamycine, anthramycine, daunomycine, rebeccamycine, etc.) (Mann, 2001; Butler, 2004). Plusieurs d'entre eux ont trouvé une application thérapeutique assez importante (Jose et Jebakumar, 2013).

Par ailleurs, il faut souligner que les autres genres d'actinomycètes tels que *Micromonospora*, *Saccharothrix*, *Actinomadura*, *Nonomuraea* etc., sécrètent aussi plusieurs molécules importantes sur le plan thérapeutique (Sarkar et Saha *et al.*, 2008; Genilloud *et al.*, 2010; Flatt *et al.*, 2013; Nakae *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013).

2.2. Importance dans le domaine agronomique

Les actinobactéries mycéliennes jouent un rôle important dans le domaine agronomique. Les chercheurs ont découvert plus de 160 plantes qui sont des hôtes des actinobactéries mycéliennes, notamment l'aulne, l'olivier de Bohème (*Eleagnus angustifolia*), les fougères douces, les broussailles amères et les rosiers des falaises.

Les actinobactéries jouent un rôle important dans le recyclage du carbone organique et sont capables de dégrader les polymères les plus récalcitrants des débris de plantes, des litières et du sol (Anandan *et al.*, 2016). De nombreuses espèces actinobactériennes ont la capacité de dégrader la lignine et les composés apparentés à la lignine, ainsi que la cellulose et l'hémicellulose (Mason *et al.*, 2001). Elles ont la capacité aussi de vivre dans un environnement huileux et peuvent donc être utilisées dans la biorestauration pour réduire les polluants pétroliers (Barabás *et al.*, 2001). *Nocardiopsis* sp. SD5 a pu dégrader des déchets de plumes en produisant une enzyme, la kératinase (Saha *et al.*, 2013). Les actinobactéries sont également capables de dégrader ou de transformer certaines toxines produites par des champignons toxigènes (mycotoxines) et de réduire ainsi leur teneur dans les produits finaux en agro-alimentaire (Teniola *et al.*, 2005).

Les actinobactéries ont un intérêt en tant que sources de composés agro-actifs en favorisant la croissance des plantes (PGPR: Plant Growth Promoting Rhizobia) et comme outils de lutte biologique contre les agents phytopathogènes d'origine tellurique (Singh Saharan *et al.*, 2014; Jog *et al.*, 2016). Les expériences menées dans ce sens révèlent des résultats prometteurs (Goudjal *et al.*, 2013; Toumatia *et al.*, 2014; Viaene *et al.*, 2016; Sathya *et al.*, 2017).

Les actinobactéries produisent aussi des antibiotiques spécialement développés pour le marché agricole. Environ 60% des nouveaux insecticides et herbicides signalés au cours des cinq dernières années proviennent de *Streptomyces* (Anandan *et al.*, 2016). Nous citerons l'exemple de la blasticidine, la kasugamycine, la validamycine A, les polyoxines, la mildiomycine, etc. (Anandan *et al.*, 2016; Arasu *et al.*, 2016) tous utilisées dans le contrôle de diverses maladies fongiques d'arbres fruitiers et de légumes. Ces composés sont également utilisés comme herbicides telles que la phosphonothrixine (Takahashi *et al.*, 1995) et la résormycine (Igarashi *et al.*, 1997).

2.3. Dans divers autres domaines

Les actinomycètes ont un rôle écologique important, comme par exemple dans la dégradation des hydrocarbures (Essien et Udosen, 2000) et la minéralisation du phénol et des déchets industriels (Bhatena *et al.*, 2002). Ils interviennent aussi dans l'industrie alimentaire comme protecteurs de certains fromages (Vandamme, 1985) et comme producteurs de certaines enzymes (ex: glucose, isomérase). Dans l'industrie des détergents, ils interviennent comme producteurs de protéases (Moreira *et al.*, 2002).

IV. LE GENRE *STREPTOMYCES* ET LA SOUCHE *STREPTOMYCES* SP. PAL114

1. Le genre *Streptomyces*

Les *Streptomyces* (du grec Streptos: courbé, tordu et Myces: moisissure) sont des bactéries mycéliennes à Gram positif et sporulantes dans des conditions de stricte aérobiose. Ce sont des bactéries ubiquistes du sol, mais retrouvées aussi en milieu marin et dans l'environnement d'une manière générale (Selvakumar *et al.*, 2015; Hug *et al.*, 2018). Certains sont des symbiotes d'éponges ou encore de chauve-souris (Hamm *et al.*, 2017).

Les souches de *Streptomyces*, comme la plupart des actinobactéries, présentent un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits (Goodfellow *et al.*, 1984). Leur cycle de développement complexe se divise en plusieurs étapes. Il débute par

la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium primaire (mycélium du substrat) formé d'hyphes ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Avec le temps, le mycélium du substrat devient plus dense, puis produit des hyphes aériens (mycélium aérien) qui se développent rapidement. La croissance rapide se fait au détriment des nutriments dérivés du substrat. Les extrémités des hyphes aériennes se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes de spores uninuclées, qui sont des agents de dissémination (Chater, 1998).

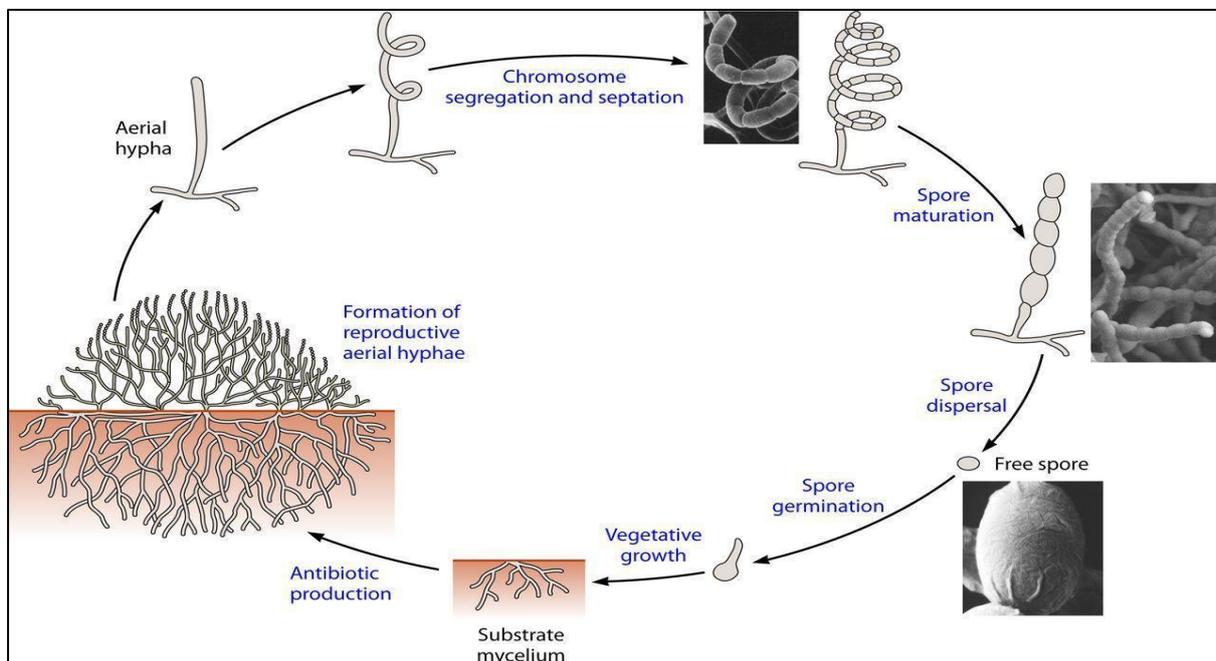


Figure 3. Cycle de développement des *Streptomyces* (Barka *et al.*, 1985).

1.1. Taxonomie du genre *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces*, proposé par Waksman et Henrici (1943), fait partie du domaine *Bacteria*, du phylum *Actinobacteria* et de la classe *Actinobacteria*. Il a été très longtemps inclus dans l'ordre des *Actinomycetales* (Garrity *et al.*, 2004).

Cependant, dans l'édition du Manuel de Bergey de 2012 et sur la base des données de la biologie moléculaire, Goodfellow *et al.* (2012) ont subdivisé cet ordre en plusieurs ordres. Le genre *Streptomyces* appartient actuellement à l'ordre des *Streptomycetales* et à la famille des *Streptomycetaceae*.

Les espèces appartenant au genre *Streptomyces* constituent la grande majorité de la famille des *Streptomycetaceae*. Ce genre englobe actuellement plus de 843 espèces avec des noms validés ainsi que 38 sous-espèces (Kemung *et al.*, 2018). Il représente non seulement une des composantes prédominantes de la population microbienne des sols à travers le monde, mais

est aussi considéré comme l'un des groupes d'espèces les plus répandues dans l'environnement (Eckwall et Schottel, 1997; Labeda *et al.*, 2012). Cependant, leur nombre et leur distribution sont fortement influencés par certains facteurs tels que la profondeur, le pH, la température, l'humidité, l'aération, le taux de matière organique et sa qualité, la charge microbienne, etc. (Sabaou *et al.*, 1998).

Morphologiquement, les espèces appartenant au genre *Streptomyces* possèdent un mycélium du substrat (MS) non fragmenté et un mycélium aérien (MA) formant des sporophores qui produisent des chaînes de spores (3 à 10, 10 à 50 ou plus de 50 spores par chaîne) de formes variées: droites à flexueuses (*Rectus Flexibilis*: type RF), en crochets ou en boucles (*Retinaculum Apertum*: type RA) ou encore spiralées (*Spira*: type S) ou parfois même verticillées pour certaines espèces (Figure 4). Les spores ne sont pas mobiles. Les ornements externes de leur surface peuvent être lisses, rugueuses, épineuses ou chevelues (figure 5).

Chimiquement, le genre *Streptomyces* est caractérisé par le chimiotype IC (Holt *et al.*, 1994), c'est-à-dire, présence de l'isomère LL de l'acide diaminopimélique (DAP) avec présence de glycine et absence de sucres caractéristiques dans leur cellules. Les phospholipides membranaires sont de type PII (Lechevalier *et al.*, 1977) et les acides gras sont sous forme ramifiée iso et antéiso, parfois insaturés et cyclopropaniques (Rezenka *et al.*, 1984). Physiologiquement, les critères consistent en plusieurs tests comme la dégradation des sources de carbone (arabinose, xylose, inositol, mannitol, fructose, rhamnose, saccharose, raffinose, etc.) sur milieu ISP9, ainsi que la production de pigments mélanoïdes sur milieux ISP6 et ISP7 (Kämpfer *et al.*, 1991). D'autres tests physiologiques importants ont par la suite été retenus (Kämpfer, 2012).

Génétiquement, les techniques moléculaires ont été développées au début des années 80 pour le genre *Streptomyces*. Ces techniques reposent sur le pourcentage en guanine-cytosine (G+C) de l'ADN qui varie entre 69 et 78 % (Holt *et al.*, 1994), sur l'analyse des séquences d'ADN codant pour l'ARNr 16S et l'analyse phylogénétique, ainsi que l'hybridation ADN-ADN (Kämpfer *et al.*, 2014).

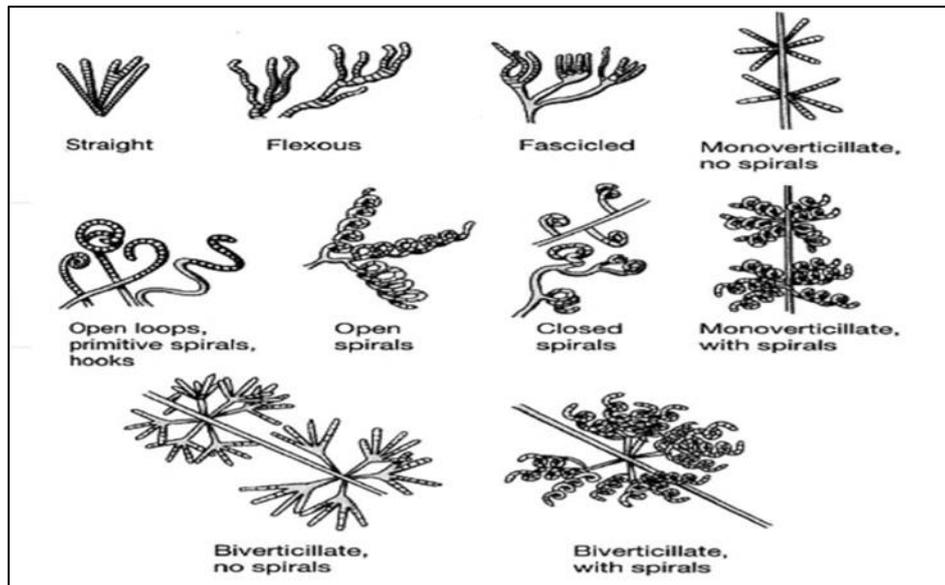


Figure 4. Types de chaînes de spores chez les espèces de *Streptomyces* (Manuel de Bergey, 2012).

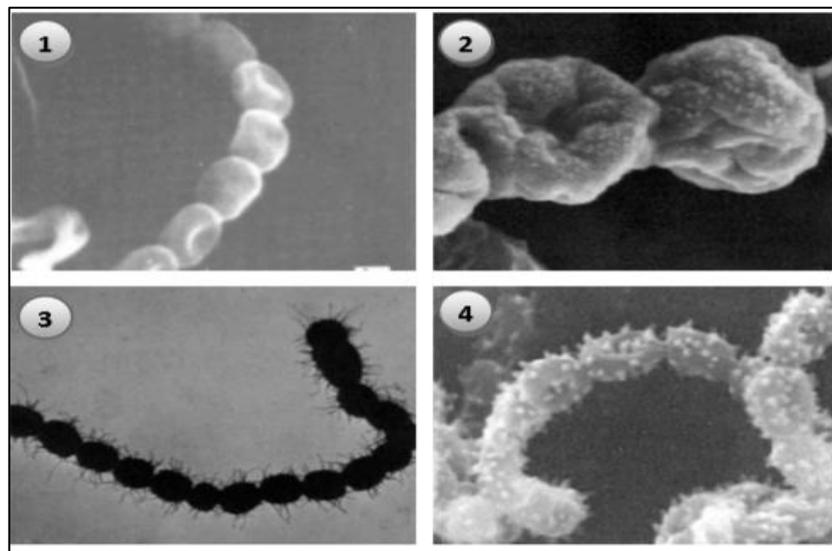


Figure 5. Morphologie de la surface des spores de quelques espèces de *Streptomyces* observée au microscope électronique à balayage (Prescott *et al.*, 2002).

Note : (1): spores lisses (smooth) de *S. viridosporus*; (2): spores rugueuses (warty) de *S. pulcher*; (3): spores chevelues (hairy) de *S. werraensis*; (4): spores épineuses (spiny) de *S. viridichromogenes*.

1.2. Métabolites secondaires sécrétés par les espèces de *Streptomyces*

La production de nombreux métabolites secondaires, y compris les antibiotiques, est couplée avec la différenciation morphologique. Les microorganismes producteurs de

métabolites secondaires synthétisent des substances bioactives et des molécules complexes durant la phase stationnaire de leur croissance (figure 6).

Cependant, en ce qui concerne les actinobactéries et les *Streptomyces* en particulier, les métabolites secondaires peuvent parfois être produits durant les phases exponentielle, stationnaire et de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

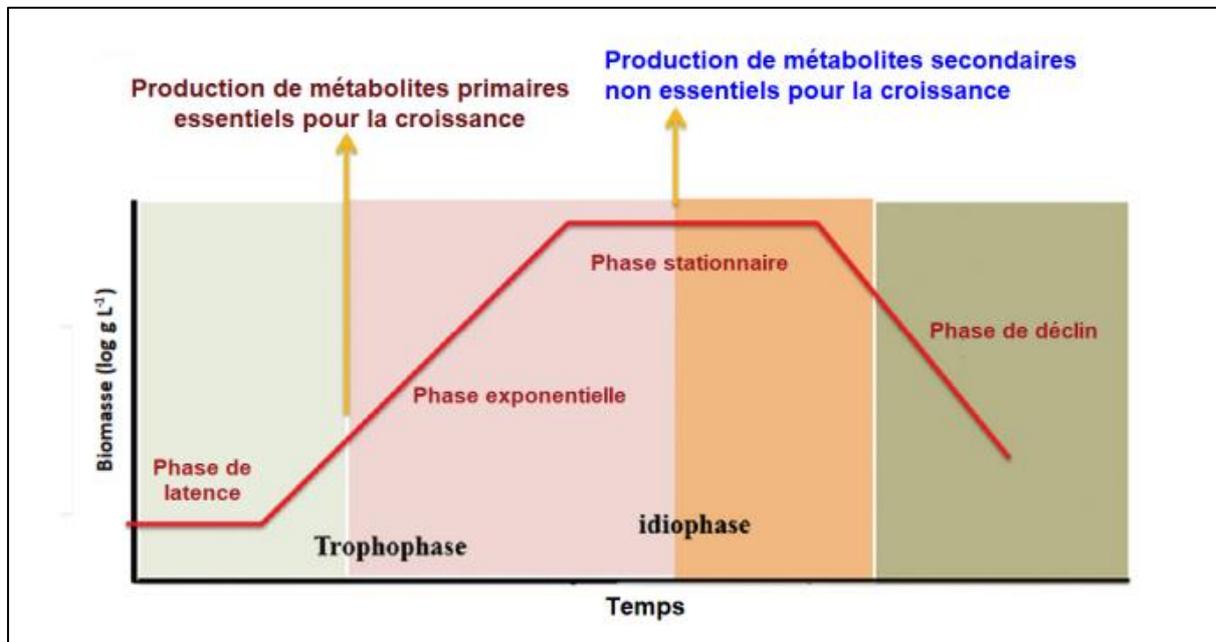


Figure 6. Phases de croissance bactérienne et de production de métabolites (Harir *et al.*, 2018).

Les *Streptomyces* sont exceptionnels pour leur cycle de développement complexe et la production de métabolites secondaires bioactifs, produisant ainsi plus d'un tiers des antibiotiques disponibles dans le commerce. Leurs métabolites secondaires possèdent des activités biologiques très variées (tableau 2). En effet les souches de *Streptomyces* sont capables de synthétiser des molécules (secondaires et primaires) à propriétés diverses (composés antifongiques, antibactériens, insecticides, herbicides, antiparasites, acaricides, nématocides, antiviraux, antitumoraux, antimitotiques, anti-allergéniques, antioxydants, enzymes, vitamines, etc.) (Hopwood, 2007; Kämpfer *et al.*, 2014).

Le premier antibiotique identifié et produit par une souche de *Streptomyces* (*S. griseus*) est la streptomycine (Schatz *et al.*, 1944), qui a été utilisée à l'époque comme traitement contre la tuberculose.

L'espèce qui est souvent utilisée comme modèle pour les *Streptomyces* est *Streptomyces coelicolor*, et plus précisément la souche A3(2). Cette souche possède de nombreux clusters impliqués dans la synthèse d'antibiotiques (actinorhodine, antibiotiques dépendants du calcium), de sidérophores (ferrioxamines, coelicheline), de pigments (tétrahydroxynaphtalène), de lipides et d'autres molécules (Bentley *et al.*, 2002).

Tableau 2. Exemples de molécules bioactives produites par les *Streptomyces*.

Métabolite secondaire	Activité	Producteur	Références
Streptomycine	Antibactérienne	<i>S. griseus</i>	(Aung , 1997)
Chloramphénicol		<i>S. venezuelae</i>	(Sekurova <i>et al.</i> , 2016)
Néomycine		<i>S. fradiae</i>	(Aung ,1997)
Rimocidine	Antifongique	<i>S. mauvecolor</i>	(Jeon <i>et al.</i> , 2016)
Nystatine		<i>S. noursei</i>	(Aung ,1997)
Antimycine A		<i>S. antibioticus</i>	(Aung ,1997)
Tunicamycine	Antivirale	<i>S. chartreusis</i>	(Larpen et Larpen gourgaud ,1997)
Hydroxymarilone C		<i>S. badius</i>	(El Sayed <i>et al.</i> , 2016)
Prasinones A et B	Insecticide	<i>S. prasinus</i>	(Box <i>et al.</i> , 1973)
Herbicidine A	Herbicide	<i>S. scopuliridis</i>	(Ha <i>et al.</i> , 2017)
Nojirimycine	Antiparasite	<i>S. ficellus</i>	(Harada <i>et al.</i> , 2017)
5-Oxomilbémycine	Acaricide et nématocide	<i>S. bingchengensis</i>	(Li <i>et al.</i> , 2017)
Bléomycine	Antimitotique	<i>S. verticillus</i>	(Qi <i>et al.</i> , 2017)
Trihydroxyisoflavone	Anti-allergénique	<i>S. avermitilis</i>	(Pandey <i>et al.</i> , 2010)
Protocatéchualdéhyde	Anti-tumorale	<i>S. lincolnensis</i>	(Kim <i>et al.</i> , 2008)
Diphénazithionine	Antioxydante	<i>S. griseus</i>	(Hosoya <i>et al.</i> , 1996)
Chitinase	Enzyme	<i>S. viridificans</i>	(Gupta <i>et al.</i> , 1995)
Vitamine B12 (cobalamine)	Vitamine	<i>S. olivaceus</i>	(Martens <i>et al.</i> , 2002)

2. La souche *Streptomyces* sp. PAL114

2.1. Origine et position taxonomique de *Streptomyces* sp. PAL114

La souche PAL114 a été isolée par Aouiche (2011) à partir d'un sol de la palmeraie d'Ahbès (Ghardaïa) en utilisant le milieu chitine-vitamines B additionné de pénicilline G (25 mg/L) et de cycloheximide (80 mg/L). Cette souche présente une bonne croissance sur les milieux ISP2, ISP4 et Bennett. Le mycélium aérien est abondant et de couleur grise. Le mycélium du substrat est non coloré, beige à brun. Les pigments diffusibles (sécrétés sur ISP2, ISP3 et Bennett) sont bruns. La sporulation est abondante. Les chaînes de spores sont longues (10 à 50 spores/chaîne) et spiralées.

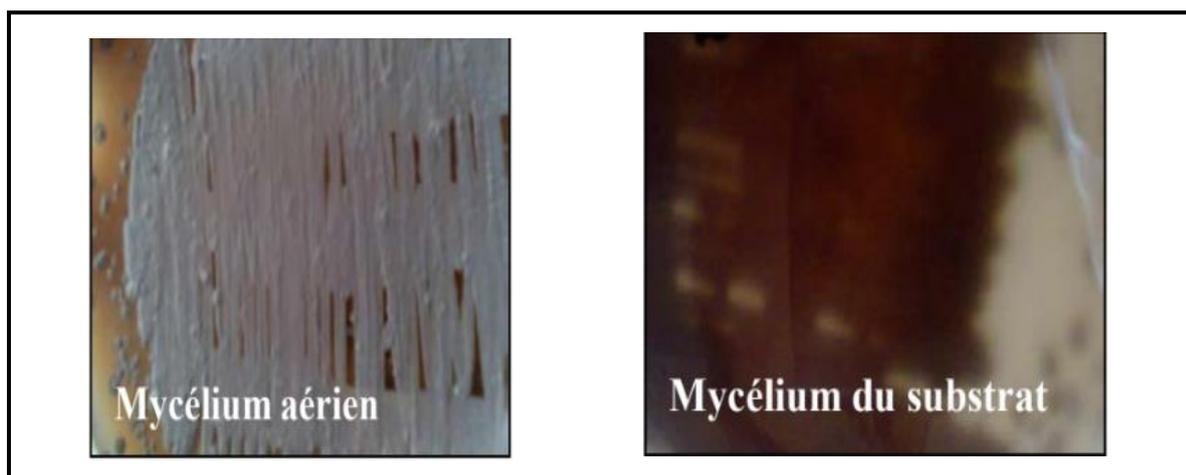


Figure 7. Macromorphologie de la souche PAL114 poussant sur milieu ISP2 (Aouiche, 2011).

Le séquençage du gène codant pour l'ARN 16S a permis de rattacher la souche PAL114 au genre *Streptomyces*, l'espèce la plus proche étant *S. griseoflavus*, avec 99,8% de similarité (Aouiche, 2013). La figure 8 montre, au niveau du dendrogramme, la position phylogénétique de la souche PAL114 vis-à-vis des souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces*.

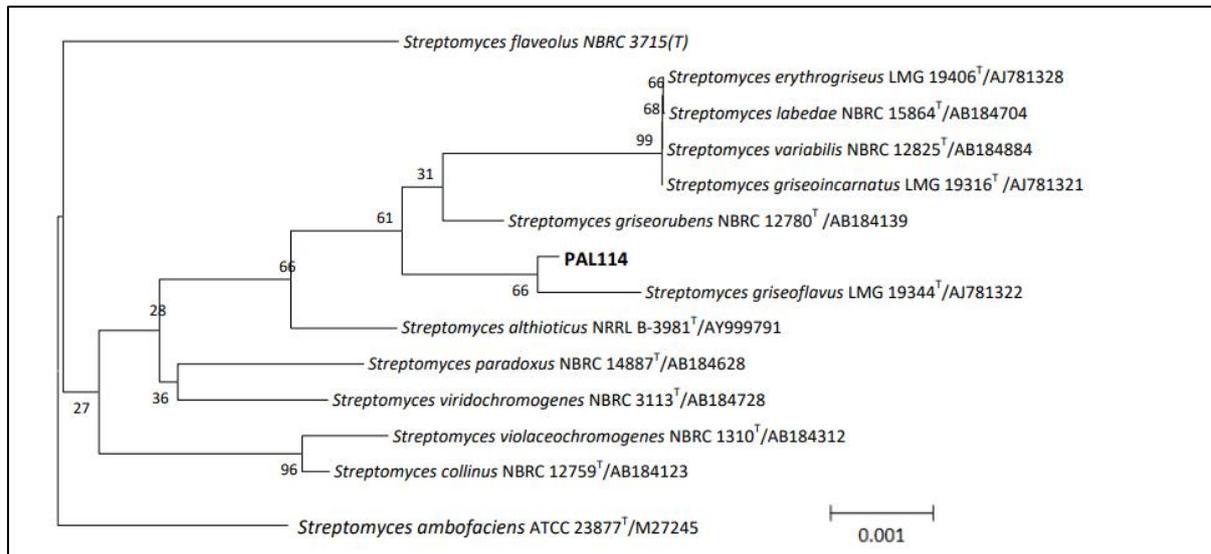


Figure 8. Arbre phylogénétique basé sur l’analyse des séquences du gène codant pour l’ARNr 16S et montrant la relation entre la souche PAL114 et les souches-types des espèces les plus proches du genre *Streptomyces* (Aouiche, 2013).

T = souche-type de l’espèce. La barre représente 1 substitution pour 1000 nucléotides.

2.2. Production d’antibiotiques

La souche PAL114 possède une activité modérée contre *Candida albicans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus carbonarius* et des bactéries à Gram positif telles que *Bacillus subtilis*.

L’activité est nulle contre les bactéries à Gram négatif et les champignons suivants : *Aspergillus flavus*, *Fusarium culmorum* et *Penicillium glabrum* (tableau 3) (Aouiche, 2013).

Tableau 3. Activité antimicrobienne de la souche PAL114 sur milieu solide ISP2 par la technique des stries croisées (zones d’inhibition en mm) (Aouiche, 2013).

Germes-cibles	E195	K12	E40	BS	SC	M1	M2	M3	IPA200	AF	AC	PG	FC
Souche PAL114	0	0	0	12	13	15	20	20	21	0	16	0	0

E195: *Escherichia coli* multirésistante aux antibiotiques. **K12:** *E. coli* sensible aux antibiotiques. **E40:** *Klebsiellapneumoniae* multirésistante aux antibiotiques. **Bs:** *Bacillus subtilis* ATCC 6633. **SC:** *Saccharomyces cerevisiae*. **M1, M2, M3 et IPA200:** *Candida albicans*. **AF:** *Aspergillus flavus*. **AC:** *Aspergillus carbonarius* M333. **PG:** *Penicillium glabrum*. **FC:** *Fusarium culmorum* Fc1.

Selon Aouiche (2011, 2013), le meilleur solvant d'extraction des antibiotiques sécrétés par la souche PAL114 est le dichlorométhane. L'analyse par HPLC de l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture (milieu ISP2) de la souche PAL114 a montré la présence de plusieurs composés bioactifs (figure 9).

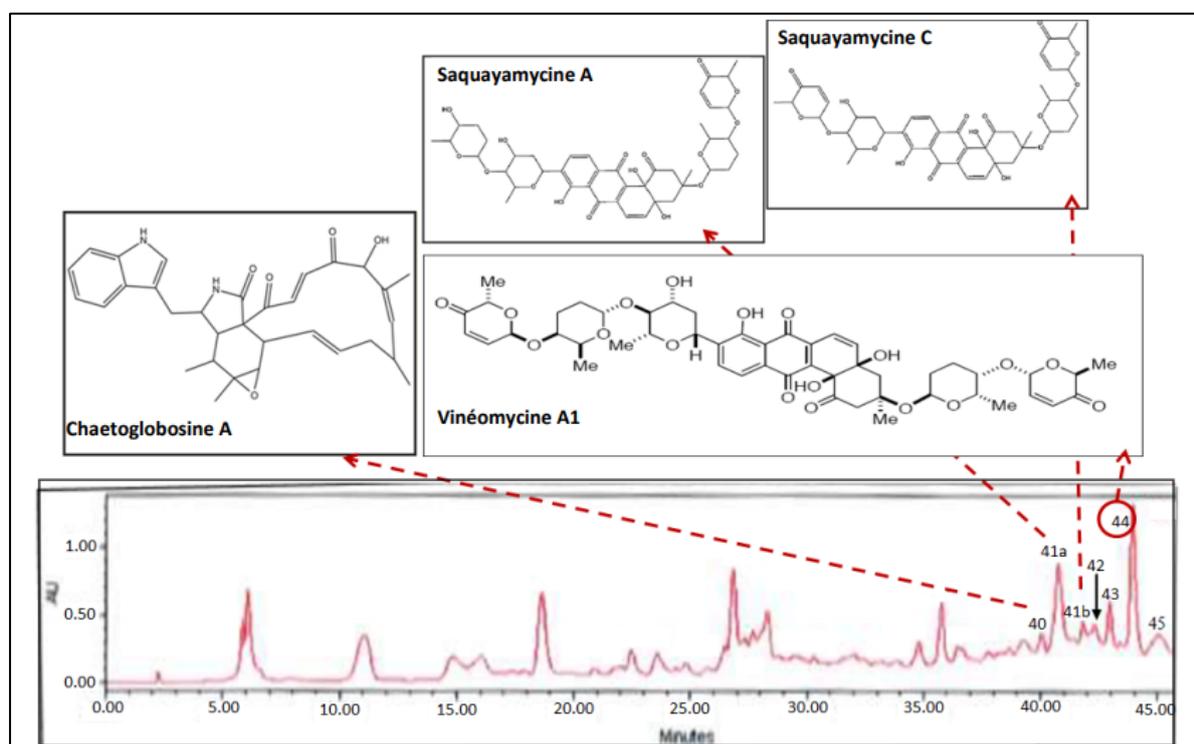


Figure 9. Profil du chromatogramme de l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture de la souche PAL114 solubilisé dans du méthanol (Aouiche, 2013).

(Colonne waters C18, gradient méthanol-eau 20-100%; débit, 2 mL/min; détection, 220 nm).

V. FACTEURS INFLUENÇANT LA PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES

La biosynthèse des antibiotiques dépend des conditions environnementales et nutritives régissant le milieu de culture dans lequel croît le micro-organisme producteur. Le milieu de culture doit être complet et contenir tous les éléments nécessaires à la croissance de l'organisme et il est en outre indispensable que ces éléments soient apportés à des concentrations optimales (Rafieenia, 2013). La variation de la composition des milieux de production des antibiotiques est un élément clé pour l'obtention des molécules actives. De nombreux travaux ont signalé l'effet des sources de carbone et d'azote sur la biosynthèse des antibiotiques, ainsi que les besoins en sels minéraux (Bouras *et al.*, 2006; Thakur *et al.*, 2009; Cho *et al.*, 2012; Falzone *et al.*, 2017). Les conditions de culture comme le pH, la température, l'aération et la vitesse d'agitation jouent aussi un rôle important dans la

production des antibiotiques (Oskay, 2011). Le rendement de production des antibiotiques est généralement augmenté suite à l'optimisation de ces facteurs nutritionnels et environnementaux pour la croissance microbienne (Ababutain *et al.*, 2013).

1. Facteurs nutritionnels

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet important sur la production des antibiotiques. En fait, plusieurs travaux rapportent que la nature des sources de carbone, d'azote, de phosphore, de potassium, de magnésium et de sels inorganiques, affecte fortement la production (Rafieenia, 2013; Hasani *et al.*, 2014).

1.1. Source de carbone

La disponibilité et le type de la source de carbone influencent fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotiques. Des sucres comme le glucose, les dextrines, le saccharose et l'amidon, constituent des substrats couramment utilisés dans les procédés fermentaires (Rafieenia, 2013). Plusieurs auteurs ont constaté que la production des molécules actives est étroitement liée à la nature de la source de carbone (Thakur *et al.*, 2009; Singh et Rai, 2012; Souagui *et al.*, 2015). Toutefois, certains substrats carbonés peuvent exercer un effet négatif sur la production. En effet, pour la plupart des microorganismes producteurs, une source de carbone rapidement assimilable comme le glucose, le glycérol, et même le citrate, peut exercer une action négative sur la production (Singh et Rai, 2012; Souagui *et al.*, 2015). Dans ce cas, la production des antibiotiques commence après que la source de carbone favorisant une croissance rapide soit entièrement métabolisée (Rafieenia, 2013).

1.2. Source d'azote

La forme sous laquelle l'azote est apporté aux cultures productrices d'antibiotiques influence nettement les rendements de production. Ces sources d'azote peuvent être divisées en deux groupes : les sources d'azote inorganique (sels d'ammonium, nitrates) et les sources d'azote organique simple ou complexe (acides aminés/extrait de levure, extrait de malt, peptone, tryptone, caséine). Les sources d'azote inorganique sont considérées comme des sources d'azote métabolisées rapidement, qui sont bénéfiques pour la croissance rapide des microorganismes. De plus, la biosynthèse des antibiotiques est également inhibée par des sources d'azote rapidement utilisées telles que l'ammonium et régulées par le phosphate

inorganique (Manikkam *et al.*, 2015). En revanche, les sources d'azote organique sont des sources d'azote durables, qui sont bénéfiques pour la croissance ainsi que l'accumulation régulière des produits (Baoxin *et al.*, 2011).

1.3. Sels et oligo-éléments

Plusieurs travaux ont montré l'implication d'autres nutriments dans la production de molécules actives par les microorganismes. Il s'agit des éléments minéraux comme le phosphore, le magnésium et le potassium, ainsi que les oligoéléments, essentiellement Fe, Co, Ni, Cu, Zn, Mo et Mn. De faibles concentrations de ces éléments stimulent la croissance et la production des antibiotiques (Mellouli *et al.*, 2003; Strub *et al.*, 2008).

2. Les facteurs physico-chimiques

2.1. Effet du pH

Les conditions de pH peuvent influencer la production des antibiotiques. Par exemple, des cellules immobilisées de *S. coelicolor*, sans contrôle du pH, produisent de l'actinorhodine, mais dans les mêmes conditions de culture, lorsque le pH est maintenu à une valeur de 7,2, la culture produit un autre métabolite, l'undécylprodigiosine (Elibol, 2002). D'une manière générale, la production d'antibiotiques est optimale à pH légèrement basique (Wang *et al.*, 2010; Oskay, 2011).

Les résultats obtenus par Boubetra (2013) sur la souche *Saccharothrix* sp. SA 198 (identifiée par la suite comme étant une nouvelle espèce, *Sx. tamanrassetensis*) montrent que la production d'antibiotiques est meilleure à pH 7. Des pH alcalins ou au contraire acides, ne favorisent pas la production.

2.2. Effet de la température

La température est un facteur physicochimique qui influence fortement la croissance et la productivité d'une souche selon qu'il s'agisse d'une souche mésophile, thermophile ou psychrophile (Larpent et Larpent-Gourgau, 1997; Lu *et al.*, 2019). Les températures optimales permettant une synthèse des antibiotiques sont généralement plus basses que celles permettant la croissance (Larpent et Sanglier, 1989).

Zitouni *et al.* (2004) ont rapporté que *Saccharothrix algeriensis* possède une gamme assez large de température de croissance, entre 18 et 45°C avec un optimum à 30°C, mais la gamme correspondant à la production des antibiotiques est beaucoup plus étroite. L'optimum de la production de thiolutine (Strub *et al.*, 2010) et des dithiolopyrrolones (Lamari *et al.*, 2002) par *Saccharothrix algeriensis* est obtenu à 30°C qui correspond à la température optimale de croissance.

2.3. Effet de l'agitation

La vitesse d'agitation est un facteur pouvant influencer la morphologie des actinobactéries en milieu liquide. L'augmentation de la vitesse d'agitation provoque un accroissement des forces de cisaillement auxquelles vont être soumis les microorganismes filamenteux. Ces forces mènent souvent à l'apparition de structures plus compactes et peuvent provoquer aussi une lyse du mycélium (Ohta *et al.*, 1995; Tamura *et al.*, 1997). L'agitation peut améliorer l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production des antibiotiques (Smaoui, 2010; Wadetwar *et al.*, 2013; van Dissel et van Wezel, 2017).

3. Inoculum

Certains chercheurs ont signalé l'importance quantitative et l'âge de l'inoculum. Cependant, la qualité de ce dernier, définie par des propriétés physiologiques et biochimiques, reste rarement évoquée (Brown et Zainudeen, 1978). Smith et Calam (1980), étudiant la production de la pénicilline et la griséofulvine, ont montré que les pelotes de mycélium denses conduisaient à de plus faibles diffusions de substrats que les pelotes ouvertes. Novikova et Makarevich (1984) ont montré une corrélation entre l'activité respiratoire de l'inoculum et la production en tétracycline de *Streptomyces aureofaciens*. La potentialité optimale de l'inoculum correspond ainsi à une activité respiratoire maximale.

4. Effet du temps d'incubation

L'évolution de la production des antibiotiques en fonction du temps d'incubation est un facteur déterminant. Chez les *Streptomyces*, elle est variable d'une espèce à une autre, voire même d'une souche à une autre (Oskay, 2011; Prasad, 2015; Souagui *et al.*, 2015). En effet, pour la souche de *Streptomyces* TN58, la production des biomolécules commence après 60 h d'incubation pour atteindre un maximum après 72 h. Elle reste stable jusqu'à 80 h puis elle

décroît progressivement pour disparaître à partir de 120 h (Mellouli *et al.*, 2004). Cependant, pour la souche *Streptomyces rochei* AK39, qui produit un métabolite antifongique, la production commence après quatre jours d'incubation pour atteindre un maximum après huit jours (Augustine *et al.*, 2005).

Chapitre II

Matériel et méthodes

I. MICROORGANISMES

1. Souche *Streptomyces* sp. PAL 114

1.1. Origine

La souche *Streptomyces* sp. PAL114 provient du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM) de Kouba, Alger. Elle a été isolée en 2010 par Aouiche à partir d'un échantillon de sol prélevé au niveau de la commune d'Ahbès (Ghardaïa) sur le milieu « chitine-vitamines B-agar » (Hayakawa et Nonomura, 1987) additionné de pénicilline G (25 mg/L) et de cycloheximide (80 mg/L) (Aouiche, 2011).

1.2. Conservation

La souche PAL114 est ensemencée à la surface du milieu ISP2 (Shirling et Gottlieb, 1966) coulé dans des tubes à vis. Ce milieu est choisi car il permet une bonne croissance et une bonne sporulation. Après incubation à 30°C pendant 10 jours, les cultures mures de la souche PAL114 sont conservées à 4°C dans une chambre froide.

Milieu ISP2 :

- Extrait de levure : 4 g. - Extrait de malt : 10 g. – Glucose : 4 g.
- Agar : 18 g. - Eau distillée : 1000 ml. – pH : 7,2.

2. Microorganismes-cibles et profils de résistance aux antibiotiques

Plusieurs souches bactériennes ont été utilisées lors de l'évaluation des propriétés antagonistes de *Streptomyces* sp. PAL114.

Bactéries à Gram positif :

Bacillus subtilis ATCC 6633, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Staphylococcus aureus* MRSA 639c (souche résistante à la méthicilline), *Staphylococcus aureus* CHU1 (souche résistante à la pénicilline G), *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Enterococcus faecalis* E1, *Listeria monocytogenes* ATCC 13932.

Bactéries à Gram négatif:

Escherichia coli E52 et *Pseudomonas aeruginosa* IPA1.

Tableau 4. Les profils de résistance aux antibiotiques de certains germes-cibles.

Microorganismes-cibles		Profils de résistance aux antibiotiques
Bactéries à Gram positif	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	NEO
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	AF, K, OXA, PEN, TE, MET
	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	OXA, FOS, CAZ, CTX, CXC, FEP, FOX, LIN, CLD, PRL, CIP
Bactéries à Gram négatif	<i>Escherichia coli</i> E52	ATM, CAZ, CTX, FEP, GEN, PIP, TIC, TOB
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPA1	AMX, CAR, ERY, GEN, NEO, SPI, SSS, VAN

Note:AF: acide fusidique; AMX: amoxicilline; ATM: aztréoname; CAR: carbénicilline; CAZ: ceftazidime; CIP: ciprofloxacine; CLD: clindamycine; CTX: céfotaxime; céfotaxime + acide clavulanique; ERY: érythromycine A; FEP: céfépime; FOS: fosfomycine; FOX: céfoxitine; GEN: gentamicine; K: kanamycine B; LIN: lincomycine; MET: méthicilline; NEO: néomycine; OXA: oxacilline; PEN: pénicilline G; PRL: pirlimycine; PIP: pipéracilline; SPI: spiramycine; SSS: sulfamide; TE: tétracycline; TIC: ticarcilline; tobramycine; VAN: vancomycine.

II. ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE *STREPTOMYCES* SP. PAL 114 SUR MILIEU SOLIDE

La recherche du pouvoir antimicrobien de la souche PAL 114 a été effectuée sur milieu solide contre divers germes-cibles : des bactéries à Gram positif et à Gram négatif. Ces microorganismes sont pathogènes pour l'homme ou non pathogènes. Ils proviennent de la collection du Laboratoire de Biologie des Systèmes Microbiens (LBSM), de l'American Type Culture Collection (ATCC) ou d'autres collections.

1. Méthode des stries croisées sur milieu solide ISP2

L'activité antimicrobienne de la souche PAL 114 a été évaluée par la technique des stries croisées sur le milieu ISP2 solide (Waksman, 1945 ; Williston *et al.*, 1947).

La souche est ensemencée en un seul trait à la surface du milieu et en bordure de la boîte de Pétri (Diamètre = 9mm) (Figure 10). Après une incubation de 8 à 10 jours à 30°C, les microorganismes cibles sont inoculés par stries perpendiculaires à l'actinobactérie. La lecture des résultats est effectuée après 24 à 48 h d'incubation et consiste à mesurer la zone d'inhibition entre le bord de l'actinobactérie et le germe cible, comme cela est illustré sur la figure 10.

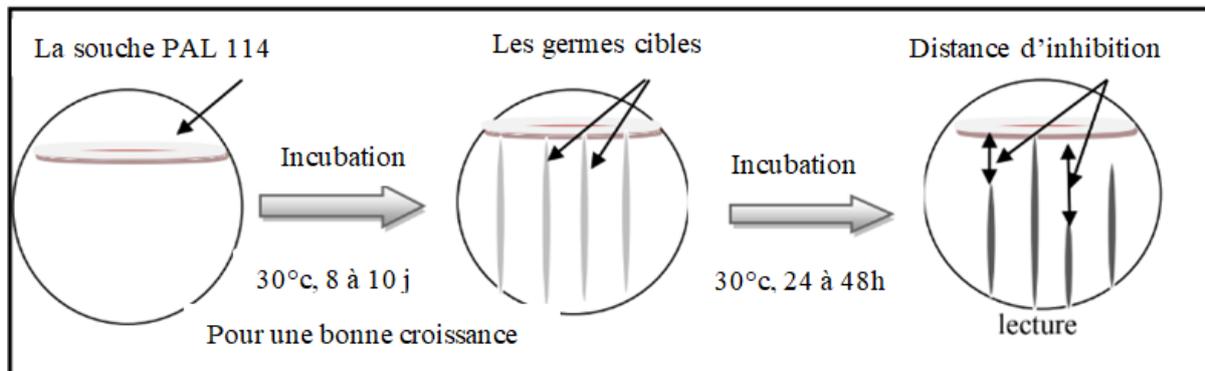


Figure 10. Schéma représentatif de la méthode des stries croisées.

III. ÉTUDE DE LA PRODUCTION DE L'ACTIVITÉ ANTIMICROBIENNE EN MILIEU LIQUIDE

En vue de rechercher le meilleur milieu de production des antibiotiques par la souche PAL 114 ainsi que d'étudier l'influence de certaines sources de carbone et d'azote sur la biosynthèse des molécules actives sécrétées par cette souche, des cinétiques ont été réalisées et suivies sur différents milieux de culture synthétiques liquides.

1. Solution minérale de base

La solution minérale de base utilisée est celle préconisée par Bouras (2005) pour la production des dithiopyrrolones par *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137.

Cette solution a été légèrement modifiée en supprimant l'extrait de levure (la souche PAL 114 étant prototrophe) et le $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ et en réduisant la quantité de CaCO_3 à 2 g (au lieu de 5 g).

La solution minérale est composée comme suit :

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

A cette solution minérale, diverses sources d'azote et de carbone sont ajoutées. La solution minérale contenant une source de carbone et une source d'azote est dénommée « milieu MS » = milieu synthétique.

2. Sources d'azote et de carbone utilisées

Le choix des sources d'azote et de carbone est basé sur les résultats de l'étude physiologique de la souche PAL 114 et d'autres souches de *Streptomyces* du LBSM.

2.1. Sources de carbone

Dans le but de déterminer une source de carbone permettant une meilleure production d'antibiotiques, trois sources de carbone ont été testées : l'amidon, le glucose et le maltose.

Ces glucides sont ajoutées chacune à raison de 1% (100 mM) (Bouras, 2005). Ces composés ont été choisis car ils sont capables d'être assimilés par la souche PAL 114 (Aouiche, 2013), en plus d'être des représentants de mono (glucose), di (maltose) et polysaccharides (amidon).

Lors de ces expériences, la source d'azote utilisée est la DL-Proline, qui est capable d'être dégradé par la souche PAL114 (Tata, 2019).

- La source de carbone permettant une production optimale sera ajoutée au milieu MS, pour étudier l'influence de quelques sources d'azote sur la production des antibiotiques.

Ababutain *et al.* (2013) ont étudié l'influence des sources de carbone sur la biomasse et le rendement en antibiotiques de la souche *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 contre *Bacillus cereus*, en utilisant le glucose, le maltose, l'amidon naturel et l'amidon soluble. Les concentrations ajoutées de chaque glucide sont montrées dans le tableau 5.

Tableau 5. Les concentrations de différentes sources de carbone testées par Ababutain *et al.* (2013).

Sources de carbone	Concentrations (g/100ml)
Glucose	2.1
Maltose	2.0
Amidon naturel	2.3
Amidon soluble	2.3

2.2. Sources d'azote

Les sources d'azotes utilisées sont : la D-L proline, la L-leucine et le D L- tryptophane. Ces acides aminés ont été additionnés au milieu MS à raison de 0,05% (poids/volume) par Tata (2019).

Par ailleurs, Da Silva *et al.*, (2012) ont également utilisés ces même acides aminés à côté d'autres molécules notamment : l'alanine, arginine, asparagine, cystéine, glycine, guanidine, glutamine, histidine, isoleucine, lysine, méthionine, phénylalanine, valine, tyrosine, acide aspartique, sérine, thréonine, extrait de levure, extrait de malt, peptone, caséine et le sulfate d'ammonium comme source d'azote additionnées au milieu MS à un intervalle de concertation de 0.5 à 1.5 g/L. En vue d'étudier l'effet de variation des conditions de cultures sur la production d'antibiotique chez trois souches de *Streptomyces* spp isolées à partir d'un échantillon de sol prélevé dans la région de Manaus, Amazonas, Brésil.

Remarque :

La proline a été choisie car elle est connue pour favoriser la production d'antibiotiques. Nous avons retenu la forme DL car elle a permis d'avoir de meilleurs résultats que la forme L lors d'expériences préliminaires. Les autres acides aminés ont été choisis car ils sont capables d'être dégradés par la souche PAL114 (Aouiche, 2013).

3. Pré-cultures

Des pré-cultures ont été réalisées dans des tubes à vis contenant chacun 5 ml de milieu de culture ISP2 ou MS. L'inoculation a été faite par des spores et des fragments mycéliens, raclés

avec une anse à ensemencer stérile, à partir de cultures poussant sur milieu ISP2 solide et âgées de 10 jours. Les tubes ont été incubés dans un shaker (30°C, 250 rpm) pendant 48 h puis ont été utilisée pour l'inoculation des milieux de production.

4. Cinétiques de production des antibiotiques en fonction des sources d'azote et de carbone

Les cinétiques de production des antibiotiques par la souche PAL114 dans le milieu liquide MS ont été réalisées en vue de montrer l'influence des sources d'azote et de carbone sur la production aussi bien quantitative que qualitative des molécules bioactives, et de déterminer le jour de production optimale.

Des fioles Erlenmeyer de 500 ml contenant 100 ml de milieu liquide (pH 7,2) sont ensemencées chacune avec la pré-culture (contenant $1 \text{ mg} \pm 0,2$ de l'actinobactérie). Les cultures sont incubées à 30°C et agitées à 250 rpm dans un shaker. Des prélèvements de 4 ml sont effectués aseptiquement à des intervalles de temps de 24 h pendant 10 jours, pour être analysés. L'évolution de l'activité antibiotique, du pH et du poids sec du mycélium est notée quotidiennement.

Chaque expérience est réalisée trois fois de manière à effectuer une moyenne et minimiser les erreurs. La figure 11 montre les étapes suivies lors des cinétiques de production des antibiotiques. Des cultures de production sont également réalisées dans le milieu ISP2 liquide, afin de pouvoir comparer les résultats avec ceux obtenus avec le milieu MS.

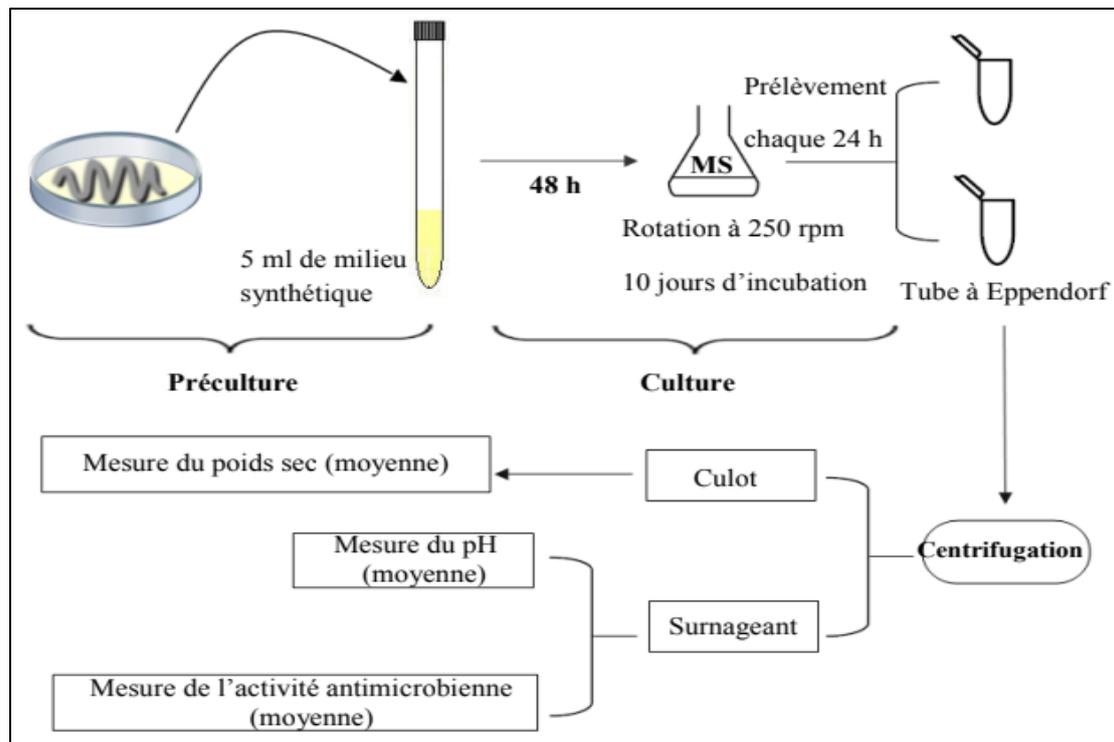


Figure 11. Schéma du protocole réalisé lors des cinétiques de production des antibiotiques sur milieux MS et ISP2, et mesure du poids sec et du pH.

4.1. Suivi de l'évolution de l'activité antimicrobienne

L'activité antimicrobienne est mesurée par la méthode de diffusion des puits (Parente *et al.*, 1995) contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et *Staphylococcus aureus* MRSA 639c résistant à la méthicilline. Les suspensions des germes-cibles sont calibrées par la méthode photométrique dans les conditions inscrites dans le tableau 6.

Tableau 6. Calibrage des suspensions des germes-cibles (Eucast, 2013).

Suspension de germe-cible			
Longueur d'onde (nm)	Absorbance	Étalon de la gamme MC Farland	CFU/ml
625	0,08-0,13	0,5	1-2×10 ⁸

- UFC = Unité Formant Colonies.

Le milieu de culture utilisé pour la réalisation des puits est l'ISP2, mais contenant 12 g d'agar par litre uniquement (semi-solide), afin de permettre une bonne diffusion des

antibiotiques. Le milieu préparé est préalablement ensemencé avec une souche-cible (suspension calibrée) : 100 µl de la suspension pour 100 ml de milieu ISP2, et cela avant d'être coulé dans des boîtes de Pétri stériles. Après coulage et solidification du milieu à température ambiante, des puits sont confectionnés à l'aide d'un emporte-pièce de 10 mm de diamètre.

Un échantillon de 2 ml de surnageant de culture est prélevé stérilement dans des tubes Eppendorf stériles. Une aliquote de 100 µl est introduite dans chaque puits. Les boîtes sont mises 2h à 4°C pour permettre la diffusion des substances actives tout en arrêtant momentanément la croissance des germes, puis incubées pendant 24 h à 30°C. La lecture des résultats se fait par la mesure du diamètre de l'auréole d'inhibition autour du puits (le diamètre de 10 mm du puits étant compris dans la mesure).

4.2. Suivi de l'évolution de la biomasse

La croissance cellulaire en fonction du temps est estimée par la mesure du poids sec de la biomasse contenue dans un volume de culture connu. Cette mesure est effectuée selon la méthode de Pfefferle *et al.* (2000), avec cependant quelques modifications comme décrit par Bouras *et al.* (2006). Pour chaque échantillon, 2 ml de culture sont prélevés toutes les 24 h et mis dans un tube Eppendorf préalablement tarés pour la quantification de la biomasse.

Les tubes sont ensuite centrifugés à 12 000 ×g pendant 10 min. Le culot est lavé deux fois avec du HCl (0,35 N) et à l'eau distillée pour éliminer le CaCO₃. Par la suite, les Eppendorfs contenant les culots cellulaires sont placés dans une étuve à 105°C pendant 24h, puis pesés (balance analytique KERN) après refroidissement.

L'expérience est réalisée trois fois de manière à effectuer une moyenne et minimiser les erreurs. Les résultats sont exprimés en gramme de matière sèche par litre de milieu de culture.

4.3. Suivi de l'évolution du pH

Le surnageant obtenu lors de la centrifugation pour la mesure du poids sec est utilisé immédiatement pour enregistrer les variations du pH au cours du temps d'incubation à l'aide d'un pH mètre HANNA instruments.

5. Extraction des antibiotiques

5.1. Extraction à partir du filtrat de culture

Les cultures de la souche PAL114 sont centrifugées afin d'éliminer la masse mycélienne. Le surnageant obtenu est extrait avec du dichlorométhane (solvant non miscible avec l'eau) dans une ampoule à décanter, à raison d'un volume de filtrat pour un volume de solvant organique. Le dichlorométhane est le meilleur solvant d'extraction selon les travaux d'Aouiche (2013). Les substances actives sont récupérées en grande majorité lors de la première extraction de sorte qu'une réextraction du filtrat n'est pas nécessaire. La phase organique est récupérée et filtrée sur papier filtre (Whatman n° 1) plissé contenant du sulfate de sodium anhydre, pour éliminer les traces d'eau résiduelles contenant les contaminants hydrophiles. Les extraits au dichlorométhane sont ensuite concentrés et évaporés sous vide à 40°C à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu obtenu est solubilisé dans du méthanol (1 ml pour un volume initial de 100 ml de culture).

5.2. Extraction à partir du mycélium

L'extraction des antibiotiques à partir du mycélium est effectuée selon la méthode de Mechliniski (1978). Après centrifugation des cultures de la souche PAL114, le mycélium est recueilli, lavé plusieurs fois à l'eau distillée, puis égoutté.

Un gramme de mycélium humide est extrait par 50 ml de méthanol, sous agitation durant 2h à température ambiante. Après filtration, l'extrait méthanolique est concentré à sec, puis récupéré dans 1 ml de méthanol afin de le tester par antibiographie.

6. Antibiographie

Les extraits obtenus à partir des filtrats de culture et du mycélium sont testés contre: *Bacillus subtilis* (ATCC 6633) et *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline MRSA 639c.

Des disques en papier de 6 mm de diamètre sont imbibés par 25 µl d'extrait organique, puis séchés totalement à froid à l'aide d'un séchoir. 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 ISP2 (12 g/L d'agar), préalablement ensemencé par la bactérie-cible. Les boîtes sont ensuite mises 2 h à 4°C pour permettre une bonne diffusion des produits actifs, puis incubées à 30°C. La lecture des résultats est effectuée après 24 h et consiste à déterminer le

diamètre de l'auréole d'inhibition autour du disque (diamètre du disque compris).

Chapitre III

Résultats et Discussion

I. ACTIVITÉ ANTAGONISTE DE *STREPTOMYCES* SP. PAL 114 SUR MILIEU SOLIDE

1. Résultats

L'activité antimicrobienne de la souche PAL114 a été évaluée par la méthode des stries croisées sur le milieu de culture ISP2 contre divers bactéries à Gram positif et à Gram négatif par Aouiche (2013) et Tata (2019), les résultats sont notés dans le tableau 7.

La souche PAL114 a montré un spectre d'action qui s'étend que sur les bactéries à Gram positif. En effet, aucune activité n'a été décelée contre les deux bactéries à Gram négatif testées. Cependant, toutes les bactéries à Gram positif testées se sont montrées sensibles à l'action de la souche PAL114, avec une meilleure activité contre *Micrococcus luteus* ATCC 9314, où une zone d'inhibition de 15 mm a été notée, suivé par *Bacillus subtilis* ATCC 6633 avec une zones d'inhibition de 12 mm. Elle est modérée contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 et faible, très faible ou nulle contre les autres microorganismes.

Tableau 7. Activité antimicrobienne de la souche PAL114 sur milieu solide ISP2.

Microorganismes-cibles	Distances d'inhibition (mm)	
	Tata (2019)	Aouiche (2013)
Bactéries à Gram positif		
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9314	15	NE
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	12	12
<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	7	NE
<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 13932	4	NE
<i>Staphylococcus aureus</i> CHU1	3	NE
<i>Enterococcus faecalis</i> E1	2	NE
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	6	NE
Bactéries à Gram négatif		
<i>Escherichia coli</i> E52	0	0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> IPA1	0	0

Note : les activités de la souche PAL114 sur milieu solide ISP2 ont été notées après une croissance de 7 à 10 jours. Seules les activités maximales sont indiquées dans le tableau. NE: test non effectué.

2. Discussion

Le pouvoir antagoniste exprimé par la souche PAL114 évalué sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées contre 7 bactéries à Gram positif et 2 bactéries à Gram négatif a montré une conformité entre les résultats de Aouiche (2013) et Tata (2019).

Aouiche (2013) a par ailleurs confirmé la résistance des bactéries à Gram négatif à la souche PAL114, en testant plusieurs espèces telles que *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter cloacae*, *Salmonella enterica* et *Pseudomonas aeruginosa*.

La plus grande résistance des bactéries à Gram négatif par rapport aux bactéries à Gram positif est un phénomène connu (Prescott *et al.*, 2002). Les premières possèdent une enveloppe cellulaire sujette à de nombreux mécanismes de résistance vis-à-vis de plusieurs antibiotiques (Gupta, 2011). Chez ce groupe de bactéries, l'enveloppe comprend la membrane externe, le périplasme et la membrane cytoplasmique; la perméabilité des deux membranes joue un rôle majeur dans la sensibilité. Elle peut en effet moduler la diffusion de l'antibiotique lors de son entrée, et réguler aussi son expulsion. Par ailleurs, cette résistance est de plus en plus accrue par les gènes mobiles sur les plasmides qui peuvent facilement se disperser au sein des populations bactériennes (Carattoli, 2009).

Nous constatons à travers cette expérience que la souche PAL114 a bien conservé son activité antibiotique. De ce fait, les cinétiques de production en milieux liquides ont été donc entreprises sur ISP2 (liquide) et sur les milieux synthétiques, de manière à comparer ces milieux, et de noter également quels sont les antibiotiques sécrétés.

II. CINÉTIQUES DE PRODUCTION DES ANTIBIOTIQUES DE LA SOUCHE PAL114 SUR MILIEUX LIQUIDES

Dans le but de choisir un milieu de culture permettant une production optimale des composés bioactifs et éventuellement de mettre en évidence de nouveaux antibiotiques chez la souche PAL114, trois groupes de cinétiques de production ont été réalisées en milieux de culture agités (Tata, 2015).

La première cinétique a été réalisée sur milieu de culture complexe (ISP2) habituellement utilisé par les chercheurs de notre laboratoire comme milieu de production.

Dans le deuxième groupe de cinétiques, l'effet de trois sources de carbone (Amidon, glucose et le maltose) a été étudié sur un milieu synthétique (MS).

Le troisième groupe de cinétiques a été effectué sur le même milieu de culture (MS) où trois sources d'azote (D-L proline, D-L tryptophane et L-Leucine) sont testées.

Il est à signaler que les trois groupes de cinétiques sont réalisées dans les mêmes conditions, à savoir la taille et l'âge de l'inoculum, les conditions de culture (température, pH, volume du milieu et agitation) et les analyses. La comparaison entre les résultats obtenus par les trois groupes de cinétiques nous permettra de retenir un milieu de production pour la souche PAL114.

Aouiche (2013) a effectué des cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL114 seulement en milieu liquide ISP2.

1. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 en milieu liquide ISP2

La croissance, le pH et l'activité antimicrobienne ont été évalués quotidiennement pendant 10 jours. La production d'antibiotiques est évaluée par la méthode de diffusion des puits contre des souches-cibles qui sont *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline MRSA 639c(Sa) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Bs) par Tata (2015) et *Aspergillus carbonarius* (M333), *Candida albicans* (M3) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (Aouiche, 2013).

Les cinétiques de croissance, de pH et de production des antibiotiques de la souche PAL114 en milieu liquide ISP2 sont illustrées par les Figure 12 et 13 (Tata ,2015) et 14 (Aouiche, 2013).

1.1. Résultats

La croissance de la souche PAL114 de *Streptomyces* en milieu ISP2 liquide en condition agitée débute par une phase exponentielle avec absence de la phase de latence. Après la phase exponentielle, une phase stationnaire est observée, suivie, après le 9^{ème} jour, d'une phase de déclin (figure 12).

En début de fermentation, le pH augmente légèrement entre J1 et J2, une diminution progressive s'ensuit jusqu'au 8^{ème} jour, pour enfin, augmenter de nouveau (J8-J10).

L'activité antibactérienne débute dès le 1^{er} jour de fermentation pour *Bacillus subtilis* ainsi que pour *Staphylococcus aureus*. Elle atteint son maximum le 2^{ème} jour de culture (figure 13), c'est-à-dire, durant la phase exponentielle. Une légère production (plus faible) est notée aussi le 6^{ème} jour contre *Staphylococcus aureus*.

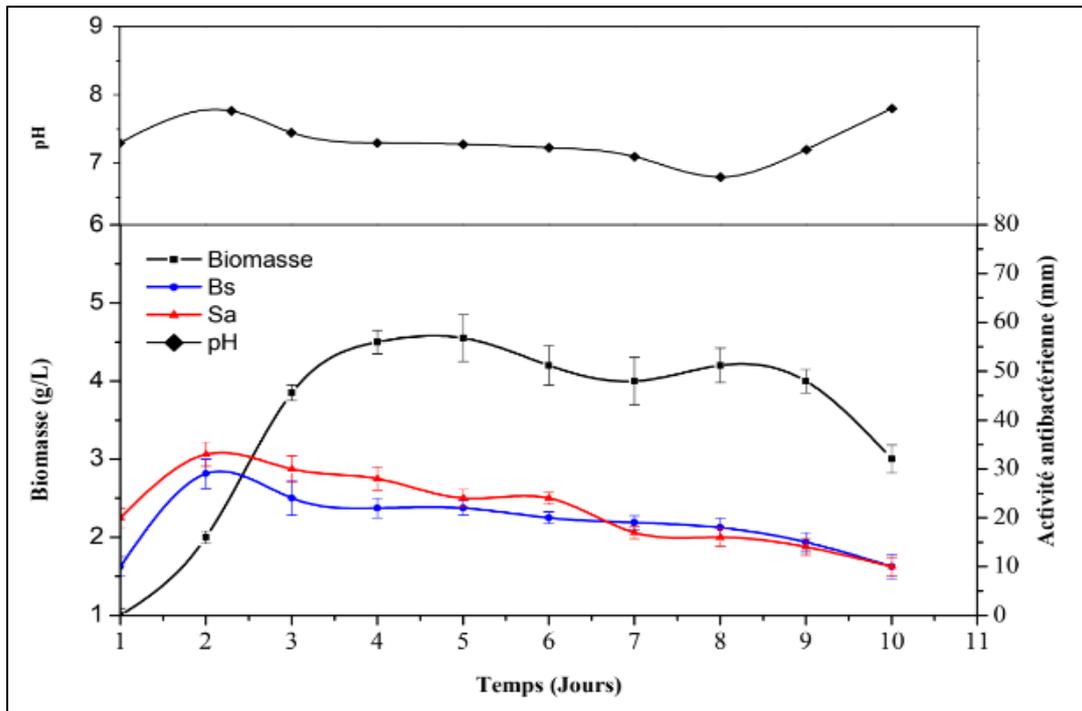


Figure 12. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 et évolution du pH et de la biomasse en milieu liquide ISP2 (Tata, 2015).

Note: **Bs:** *Bacillus subtilis* ATCC 6633; **Sa:** *Staphylococcus aureus* MRSA 639c.

- Tous les essais ont été effectués en trois fois et chaque valeur représente la moyenne de trois essais.
- Les barres verticales représentant les écarts-types calculés à partir de trois répétitions.

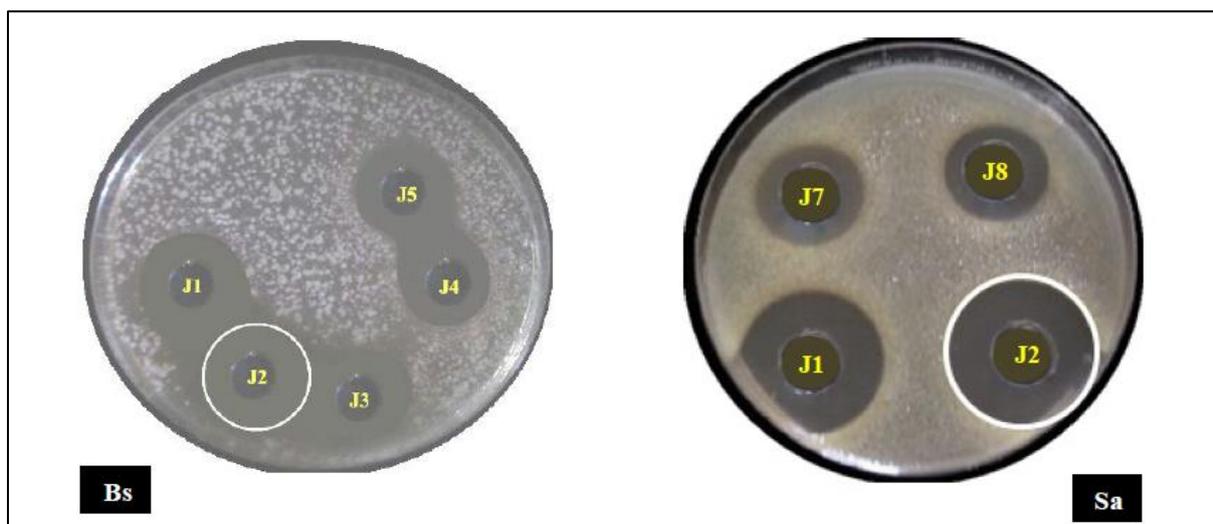


Figure 13. Activité de la souche PAL114 contre *B. subtilis* ATCC 6633 (Bs à gauche) et *S. aureus* 639c (Sa à droite) par la méthode de diffusion des puits (Tata, 2015).

Par ailleurs, les résultats obtenus par Aouiche (2013) ont montré que la croissance débute par une phase d'accélération (J0 à J1) puis une phase exponentielle de 48 h (J1 à J3) suivie d'une phase de déclin jusqu'au 10^{ème} jour (avec une stabilisation entre J5 et J7), s'ensuit une croissance additive (ou croissance cryptique) notée entre le 10^{ème} et le 13^{ème} jour.

Le pH augmente légèrement (de 7,2 à 7,5) entre J0 et J1 puis diminue (de 7,5 à 6,2) entre J1 et J2 pour augmenter de nouveau de manière progressive jusqu'au 14^{ème} jour (pH = 8,5).

L'activité maximale de la souche PAL 114 est notée durant la fin de la phase exponentielle et surtout durant la phase de déclin, entre le 3^{ème} et le 5^{ème} jour pour *Bacillus subtilis* et *Candida albicans*, et le 6^{ème} jour pour *Aspergillus carbonarius*. Cependant, pour ce dernier, une autre activité, encore plus importante, est observée à la fin de la croissance cryptique.

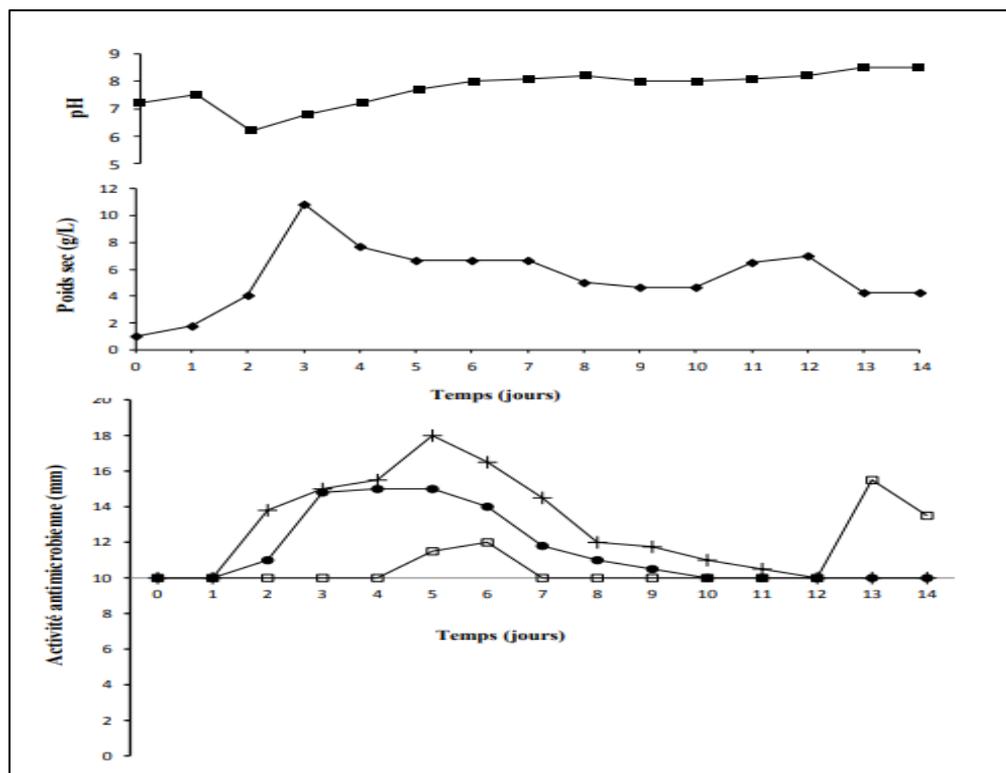


Figure 14. Cinétiques de l'évolution de la croissance, du pH et des activités antimicrobiennes de la souche PAL114 dans le milieu liquide ISP2, contre *Candida albicans* M3 (cercle rempli), *Aspergillus carbonarius* M333 (carré vide) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (croix) (Aouiche, 2013).

- Le diamètre du puits (10 mm) est compris dans la mesure de l'activité antibactérienne.

1.2. Discussion

La courbe de croissance de la souche PAL114 de *Streptomyces* en milieu ISP2 liquide montre une absence de la phase de latence, cette dernière peut être expliquée par le fait que les conditions des pré-cultures sont similaires à ceux des cultures (même milieu, culture jeune déjà en phase exponentielle).

Cependant, les résultats obtenus par Aouiche, 2013 ont montré la présence d'une croissance cryptique qui peut être expliquée par le fait que les cellules encore vivantes utilisent les débris des cellules mortes durant la phase de déclin comme substrat. Cette croissance additive a aussi été observé chez plusieurs souches de *Streptomyces* (Driche, 2010; Toumatia, 2010).

Le pH présente une variation au cours de la fermentation. La dégradation par désamination des acides aminés présents dans l'extrait de levure de l'ISP2 induit à la libération de l'ammonium. L'accumulation de ce dernier provoque l'augmentation du pH du milieu, comme l'a souligné Strub (2008) pour *Saccharothrix algeriensis*. La diminution de pH peut être expliquée par la dégradation des glucides présents dans le milieu de culture. Ceci a déjà été signalé chez des actinobactéries notamment chez les *Saccharothrix* comme *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 (Boubetra, 2013) et *Saccharothrix* sp. PAL54 (Aouiche *et al.*, 2012).

Les résultats montrent que l'activité antimicrobienne maximale est notée durant la fin de la phase exponentielle et surtout durant la phase de déclin (Aouiche, 2013). Par ailleurs, Tata, 2015 a rapporté que l'activité antibactérienne débute dès le 1^{er} jour de la fermentation et le maxima d'activité est obtenu durant la phase exponentielle.

Généralement, les microorganismes produisent les métabolites secondaires durant les phases de ralentissement et stationnaire, mais dans le cas des actinobactéries, cette production peut avoir lieu en phase exponentielle, stationnaire ou de déclin (Zitouni, 2005; Badji, 2006).

Il est à signaler que le passage en milieu liquide ISP2 a donné des résultats différents. La souche PAL114 a montré une forte activité contre *B. subtilis* ATCC 6633 et encore plus forte contre *S. aureus* MRSA 639c (et même plus forte que celle contre *B. subtilis*) contrairement à ce qui a été montré sur milieu solide (Tata, 2015). Aouiche (2013) a détecté également en milieu liquide une forte activité contre *B. subtilis* ATCC 6633, mais aussi une activité modérée contre *A. carbonarius* M333 et *C. albicans* M3.

2. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 sur milieu MS-DL-proline additionné de différentes sources de carbone

En utilisant comme milieu de base le milieu MS avec la D-L proline comme source d'azote (MS-D-L proline) pour la pré-culture et la culture, trois sources de carbone ont été testées : glucose, maltose et amidon (Tata, 2015).

L'effet de l'approvisionnement de certains besoins nutritionnels sur le poids sec et la productivité de l'agent antimicrobien a été également étudié par Ababutain *et al.*, (2013) chez *Streptomyces* sp MS-266 Dm4.

2.1. Résultats

Les résultats de la production des antibiotiques de la souche PAL114 sur le milieu MS-DL-proline en additionnant des différentes sources de carbone sont illustrés dans la figure 15.

2.1.1. Milieu MS + glucose

En présence de glucose, la croissance de la souche débute par une phase exponentielle qui s'étend jusqu'au 5^{ème} jour puis une courte phase stationnaire de 24h, suivie d'une phase de déclin.

On note une diminution du pH entre J1 et J3, puis une augmentation entre J3 et J4 suivie d'une diminution progressive jusqu'à J10 (pH= 7).

L'activité antibactérienne de la souche PAL114 débute dès le J1 et atteint son maximum le 2^{ème} jour (phase exponentielle) : 24 mm contre *Bacillus subtilis* (Bs) et 30 mm contre *Staphylococcus aureus* (Sa). Le 5^{ème} jour un léger regain d'activité est observé, notamment contre *Bacillus subtilis* (Bs).

2.1.2. Milieu MS + maltose

La courbe de croissance sur le milieu MS additionné de maltose commence par une phase exponentielle de 48h (J1-J3), suivie d'une phase de déclin jusqu'à J6 puis une reprise de croissance (croissance cryptique) et une 2^{ème} phase de déclin dès le J7.

Cependant, le milieu devient alcalin les premiers temps puis acide jusqu'à J3. Ensuite, le pH augmente légèrement puis diminue progressivement à nouveau (J4-J8), une légère ré-augmentation du pH est suivie d'une diminution (J10).

Les maxima d'activité sont obtenus entre le 1^{er} et le 2^{ème} jour, mais ces activités sont relativement faibles: 18 mm contre *Bacillus subtilis* (Bs) et 20 mm contre *Staphylococcus aureus* (Sa).

2.1.3. Milieu MS + amidon

En présence de l'amidon, la croissance débute par une phase exponentielle d'une durée de 3 jours, suivie d'une courte phase de ralentissement puis d'une phase stationnaire. Par la suite, une phase de déclin est observée jusqu'au 10^{ème} jour.

En début de fermentation, le pH est relativement stable (J1-J3) puis diminue (J3-J5), une lente augmentation s'ensuit, suivie d'une diminution de nouveau pour que le pH revienne à sa valeur initiale.

Les résultats montrent que l'amidon a permis d'obtenir plusieurs activités maximales (4^{ème} jour et entre 6^{ème} et 8^{ème} jour), la meilleure activité est obtenue le 4^{ème} jour (phase stationnaire) : 25 mm contre *Bacillus subtilis* (Bs) et 36 mm contre *Staphylococcus aureus* (Sa).

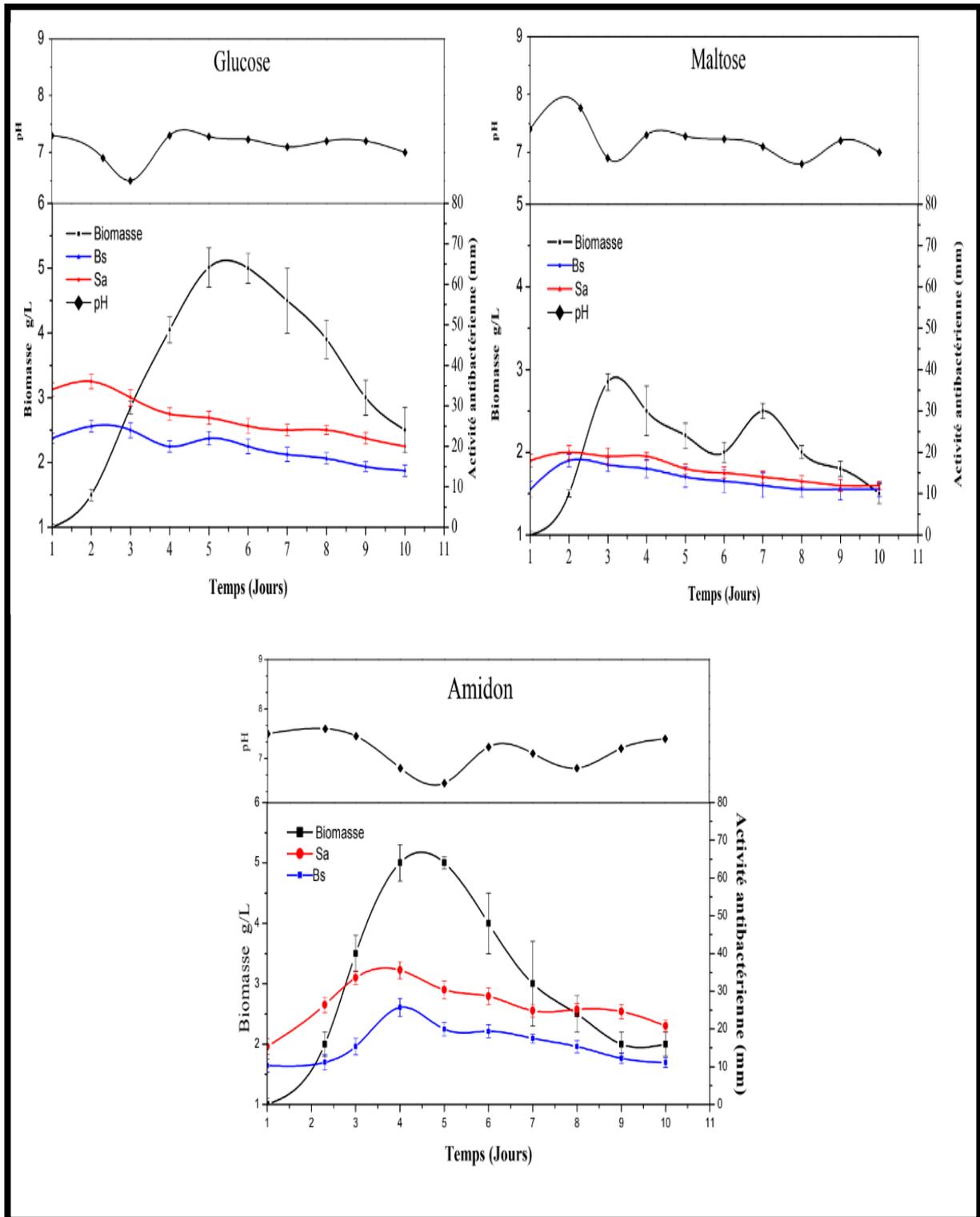


Figure 15. Cinétiques de production des activités antimicrobiennes et évolution du pH et de la biomasse, en milieu liquide MS-DL-proline additionné de différentes sources de carbone (Tata, 2015).

Le tableau 8 montre l'effet de l'ajout de différentes sources de carbone sur le poids sec et l'activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 contre *B. cereus*. Parmi les différentes sources de carbone utilisées, un bon rendement en antibiotique a été obtenu avec l'amidon soluble et le glucose (25mm). En outre, les résultats montrent que cette souche ne peut pas utiliser le maltose pour la production d'antibiotiques. Tandis que, l'amidon naturel empêche l'activité antimicrobienne et la croissance. Le poids sec le plus élevé est enregistré avec l'addition d'amidon soluble (1.1 g/100ml) suivie par le maltose (0.4 g/100ml) puis le glucose (0.2 g/100ml).

Tableau 8. L'effet des différentes sources de carbone sur le poids sec et la productivité de l'agent antimicrobien par *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 contre *B. cereus* (Ababutain *et al.*, 2013).

Sources de carbone	Biomasse (g/100 ml)	Diamètre de zone d'inhibition (mm)
Glucose	0.2	25
Maltose	0.4	0.0
Amidon naturel	0.0	0.0
Amidon soluble	1.1	25

2.2. Discussion

La capacité de *Streptomyces* sp. PAL114 à produire des molécules bioactives est fortement lié à la composition du milieu de culture notamment les sources de carbone.

L'évaluation des activités contre *Bacillus subtilis* (Bs) et *Staphylococcus aureus* (Sa) (au jour de production optimale) issues du milieu MS-DL proline additionné de différentes sources de carbone a montré que l'amidon (polysaccharide) et le glucose (monosaccharide) ont permis à la fois une bonne croissance et une meilleure activité antibactérienne de la souche PAL114, sauf que le jour de production optimale diffère (2^{ème} jour en présence de glucose et 4^{ème} jour dans le cas de l'amidon). L'activité est moindre en présence de maltose.

Les travaux de Lebrihi *et al.*, (1988) et Lounès *et al.*, (1996) rapportent que les sources de carbone lentement assimilées comme les polysaccharides (tel que l'amidon) permettent d'avoir un apport de carbone de façon lente, mais continue, et donc, de meilleurs rendements de production d'antibiotiques.

En revanche, plusieurs autres recherches ont prouvé l'efficacité du glucose comme étant la source de carbone permettant une bonne production d'antibiotiques chez les *Streptomyces* tel que *Streptomyces rimosus* (Singh et Rai, 2012) ainsi que chez les *Saccharothrix* tel que *Saccharothrix tamanrassetensis* SA198 (Laassami, 2015). Par ailleurs, Zitouni (2005) a montré un effet répressif de ce sucre sur la production d'antibiotiques nucléosidiques par *Saccharothrix* sp. SA103.

Dans le cas de cette étude, le glucose s'est avéré être à priori plus intéressant que l'amidon, vu le maximum d'activité (qui est le même pour les deux) obtenu de manière plus précoce. Cependant, sachant que la souche PAL114 sécrète plusieurs antibiotiques, il se pourrait que le glucose favorise uniquement la production de l'antibiotique sécrété le 2^{ème} jour et que l'amidon favoriserait non seulement celui sécrété le 2^{ème} jour, mais aussi le 4^{ème} jour.

Le résultat avec l'amidon comme meilleure source de carbone corrèle avec celui obtenu par Elattal *et al.* (2011) lors de la production des antifongiques par une souche de *Streptomyces noursei*, ainsi que les travaux de Rafieenia (2013) qui rapportent que les composés tels que l'amidon, la dextrine et le glycérol sont généralement les meilleures sources de carbone pour la production d'antibiotiques par les espèces de *Streptomyces*.

Ababutain *et al.* (2013) à leur tour, rapportent que la croissance maximale et la meilleure production d'antibiotiques ont été obtenues dans des cultures additionnées d'amidon soluble comme source de carbone. De nombreux chercheurs ont constaté que l'amidon est la meilleure source de carbone pour la productivité la plus élevée de la substance active comme c'est le cas chez *Streptomyces aburaviensis* IDA-28 (Raytapadar et Paul., 2001).

Cependant, les cultures contenant du maltose ou de l'amidon naturel n'ont produit aucune quantité détectable d'antibiotique. Ceci a été également démontré par EL-Naggar (1991) lors de l'étude de la production d'antimicrobiens par *Streptomyces nasri*.

De ce fait, l'utilisation des glucides comme source de carbone révèle une relation étroite entre le métabolisme glucidique et la production d'antibiotique par les microorganismes notamment les *Streptomyces*.

3. Cinétiques de production des antibiotiques de la souche PAL114 sur milieu MS-Amidon additionné de différentes sources d'azotes

3.1. Résultats

Les résultats de cette étude sont illustrés par la figure 16.

3.1.1. Milieu MS + DL-Proline

En présence de la DL-proline, la croissance évolue rapidement. La courbe de croissance est divisée en trois phases; une phase exponentielle d'une durée de 4 jours et une phase stationnaire suivie par une phase de déclin très lente.

Le pH initial qui était à 7,5 reste stable jusqu'au 3^{ème} jour. Il tend ensuite à diminuer durant la phase stationnaire, puis augmente lentement et devient alcalin, avec un maximum le 10^{ème} jour de fermentation.

La DL-proline a permis d'avoir un maximum d'inhibition de 32 mm contre *Bacillus subtilis* et de 42 mm contre *Staphylococcus aureus*. C'est la meilleure activité enregistrée lors de cette étude. Cette activité apparaît le 2^{ème} jour et atteint son maximum le 4^{ème} jour. Elle diminue puis a tendance à se stabiliser.

3.1.2. Milieu MS + L-leucine

Dans le milieu MS-amidon additionné de L-leucine, la croissance commence par une phase exponentielle jusqu'au 4^{ème} jour (avec un léger ralentissement entre J2 et J3), suivie d'une phase stationnaire, puis une phase de croissance additive ou cryptique. Le pH reste plus ou moins stable, mais avec une légère acidification à la fin de la fermentation.

Une activité antibactérienne est observée dès le 2^{ème} jour. Elle augmente pour atteindre son maximum le 4^{ème} jour. Nous notons un diamètre d'inhibition maximal de 20 mm contre *Bacillus subtilis* et 30 mm contre *Staphylococcus aureus*. Cette activité maximale est observée le 4^{ème} jour. A chaque fois, la production est associée à la croissance.

3.1.3. Milieu MS + DL-Tryptophane

Dans le milieu MS-amidon additionné de DL-tryptophane, la courbe de croissance débute par une phase exponentielle qui dure 4 jours, suivie par un léger ralentissement. Par la suite, une phase stationnaire est observée entre J4 et J5. La phase de déclin commence au-delà du

5^{ème} jour. La biomasse produite au niveau de ce milieu est nettement meilleure, car le poids sec a atteint une valeur de 15 g/L au 4^{ème} et 5^{ème} jours.

Le pH devient basique progressivement pour atteindre 8,8 le 6^{ème} jour, ensuite il diminue. Aucune activité antimicrobienne (contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*) n'a été obtenue au niveau de ce milieu.

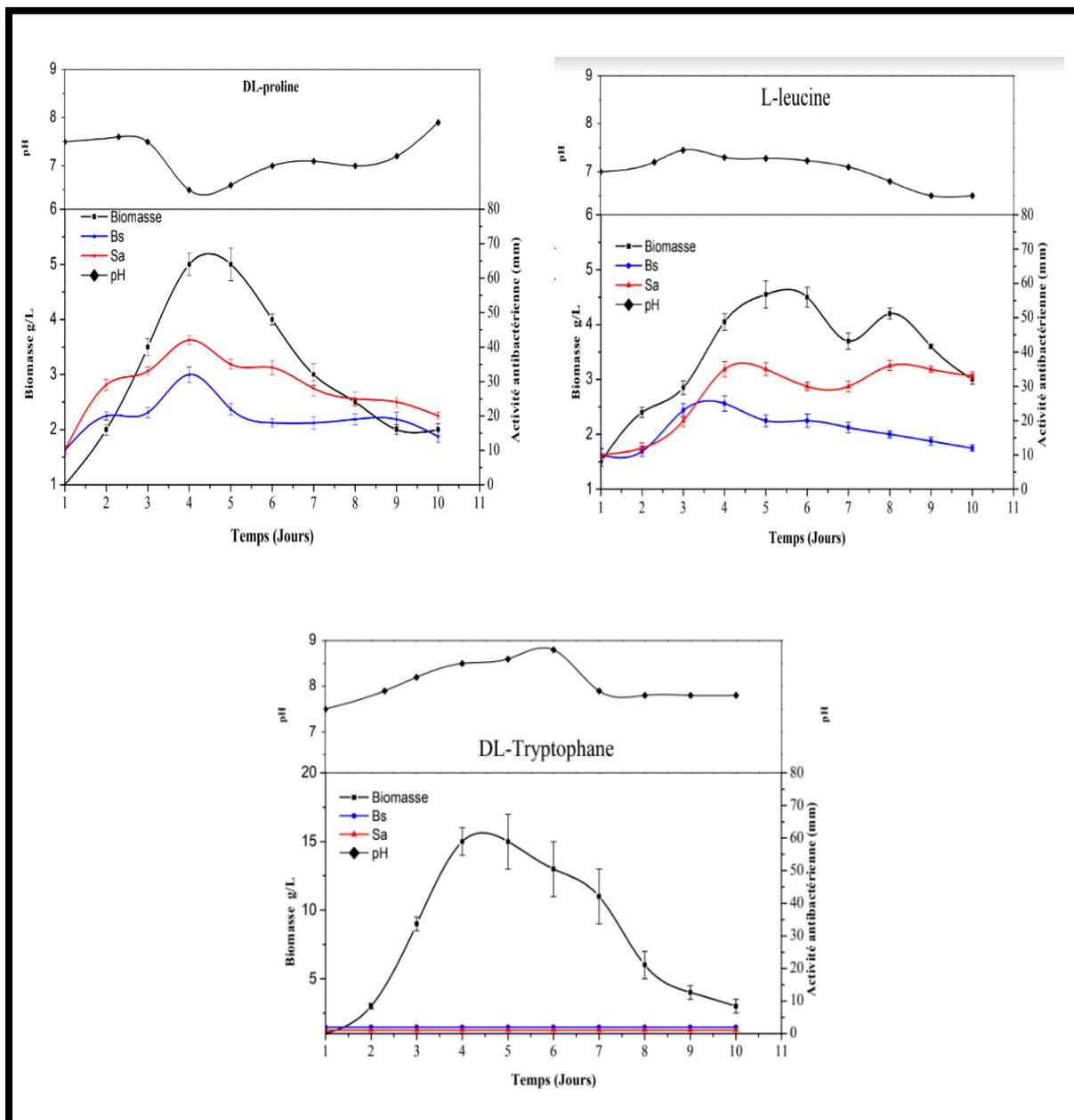


Figure 16. Cinétiques de production des antibiotiques antibactériens et évolution du pH et de la biomasse de la souche PAL114 cultivée dans le milieu MS-amidon additionné de différentes sources d'azote (Tata, 2015).

L'étude de l'effet des acides aminés, notamment la proline, le tryptophane et la leucine par Da Silva *et al.* (2012) sur la production des antibiotiques par trois souches de *Streptomyces spp* isolées du sol amazonien a montré que la phénylalanine, le sulfate d'ammonium, l'asparagine et la peptone sont les meilleures sources d'azote pour la production des antibiotiques.

3.2. Discussion

Les résultats des cinétiques en fonction des différentes sources d'azote révèlent que la quantité de la biomasse et la production d'antibiotiques sont influencées par la nature de la source d'azote ajoutée au milieu de culture. Il est rapporté dans la littérature que les sources d'azote peuvent être partagées parmi celles qui stimulent, inhibent ou restent neutres envers la production des métabolites secondaires (Untrau *et al.*, 1994).

La croissance de la souche PAL114 dans le milieu MS-amidon additionné de différentes sources d'azote débute par une phase exponentielle. L'absence d'une phase de latence, connue pour être due au temps d'adaptation des microorganismes aux nouvelles conditions de culture, ainsi qu'à l'âge de l'inoculum, peut être expliquée par le fait que nos pré-cultures soient menées dans les mêmes conditions que les cultures et qu'elles soient prises en phase exponentielle de croissance.

L'évolution du pH au cours de l'incubation présente une variation assez légère (une acidification, puis une basification). L'acidification serait due à la dégradation des glucides présents dans les milieux (source de carbone). La dégradation des sources azotées organiques, induit la basification du milieu après libération et accumulation de l'ammoniac, et ce, suite à une désamination des sources d'azote.

De telles constatations ont été énoncées par Strub (2008) pour expliquer l'augmentation du pH par l'apparition des ions ammonium dans la culture de *Saccharothrix algeriensis* lors de la croissance et de la synthèse des antibiotiques.

De nombreuses études ont été réalisées dans ce contexte sur l'effet des sources d'azote sur la production d'antibiotiques. Par exemple, la L-proline s'est révélée être la meilleure source d'azote pour la production de chloramphénicol par *Streptomyces venezuelae* (Shapiro et Vining, 1985). Ceci a également été constaté chez *Streptomyces griseus* pour la production de la streptomycine (Dulaney, 1948).

Pour le milieu MS-amidon contenant la L-leucine, nous avons observé après la phase de déclin une croissance additive (assez faible), appelée communément croissance cryptique, laquelle a déjà été signalée chez plusieurs microorganismes, notamment chez les entérobactéries (Prescott *et al.*, 2002). Cette croissance cryptique peut être expliquée par le fait que les cellules encore vivantes utilisent comme substrat les débris des cellules mortes qui se sont lysées durant la phase de déclin. Ce phénomène a aussi été observé chez plusieurs souches de *Streptomyces* (Driche, 2010; Toumatia, 2010; Aouiche, 2013).

D'autre part, le DL-tryptophane, stimule la croissance et entraîne une augmentation significative de la biomasse arrivant à un poids sec de 15 g/L (meilleur poids sec obtenu lors de cette étude).

Nous avons constaté que l'activité antibactérienne en présence de la DL-proline est nettement meilleure que celle observée par la L-leucine. En revanche, aucune activité antimicrobienne n'est obtenue avec le L-tryptophane.

Par ailleurs, les résultats obtenus par Da Silva *et al.* (2012) montrent que chaque souche de *Streptomyces* a son propre comportement, ce qui exige des conditions spécifiques à chacune d'elles pour la production des métabolites secondaires. La D-L proline n'est pas forcément la meilleur source d'azote pour toutes les souches, ni le D-L tryptophane qui n'a aucun effet sur la production des antibiotiques. En effet, chaque *actinobacteria* a son propre métabolisme.

III. ACTIVITÉS DES EXTRAITS DES SURNAGEANTS DE CULTURE ET DE LA BIOMASSE MYCÉLIENNE

L'extraction des antibiotiques sécrétés par *Streptomyces* sp. PAL114 est réalisée selon le protocole annoncé dans la partie « Matériel et méthodes », au jour optimal de la production.

1. Résultats

Le tableau 9 résume l'ensemble des résultats obtenus par Aouiche (2013). Les extraits organiques et aqueux sont concentrés à sec, puis récupérés dans 0,5 ml de méthanol pour tester leur activité par la méthode des disques de papier (25 µl par disque) contre *Klebsiella pneumoniae* (E40), *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Candida albicans* M3 et *Aspergillus carbonarius* (M333) (Aouiche,2013).

Ces résultats montrent que le meilleur solvant d'extraction de l'activité antibiotique est le dichlorométhane avec un diamètre d'inhibition de 32 mm contre *Candida albicans*, 23 mm

contre *Bacillus subtilis* ATCC 6633 et 12 mm contre *Aspergillus carbonarius*. Les autres solvants (notamment le n-butanol) extraient plus d'impuretés et moins d'activité.

L'activité de l'extrait mycélien a aussi été testée après macération agitée de 1 g de biomasse dans 40 ml de méthanol pendant 2 h. Après filtration, l'extrait méthanolique est concentré à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif puis récupéré dans 0,5 ml de méthanol pour être testé par la méthode d'antibiographie (25 µl par disque de papier) contre les quatre microorganismes-cibles. Les résultats obtenus ont montré que l'extrait mycélien de la souche PAL114 présente une faible activité (11 mm) dirigée uniquement contre *Candida albicans* M3.

Tableau 9. Activités antimicrobiennes des extraits organiques du filtrat de culture de la souche PAL114. (Aouiche, 2013).

		Diamètre d'inhibition des microorganismes-cibles (en mm)			
Souche d'actinomycète	Solvant d'extraction	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	<i>Klebsiella pneumoniae</i> (E40)	<i>Candida albicans</i> (M3)	<i>Aspergillus carbonarius</i> M333
PAL 114	Acétate d'éthyle	22	0	30	0
	n-butanol	19	0	30	0
	Dichlorométhane	23	0	32	12
	n-hexane	10	0	27	0

- Les tests ont été effectués par antibiographie. Le diamètre des disques de papier (6 mm) est compris dans la mesure des activités. 0 = pas d'activité autour du disque.

Le tableau 10 regroupe l'ensemble des résultats obtenus par Tata (2019). Les extraits du surnageant de culture (au dichlorométhane) et de la biomasse mycélienne (au méthanol) ont été testés contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c (50µl par disque) et *Bacillus subtilis* ATCC 6633 (20 µl par disque) par antibiographie.

1.1. Activités sur milieu ISP2 liquide

De bonnes activités antibactériennes se sont montrées dans la phase organique de l'extrait au dichlorométhane de la souche PAL114 poussant sur milieu ISP2 et testé par antibiographie, contre *S. aureus* (25 mm) et *B. subtilis* (16 mm).

On note également des activités antibiotiques contre les mêmes germes-cibles, dans l'extrait mycélien, avec des diamètres d'inhibition de 17 mm contre *S. aureus* et 11 mm avec *Bacillus subtilis*.

1.2. Activités sur milieu MS + DL-proline additionné de différentes sources de carbone

Les activités des surnageants de culture obtenues au jour optimale, après extraction au dichlorométhane ainsi que celles des extraits méthanoliques du mycélium provenant des milieux MS + DL-proline additionné de différentes sources de carbone ont également été testées pour leurs antagonismes par la méthode des disques de papier (antibiographie), contre *S. aureus* MRSA 639c et *B. subtilis* ATCC 6633.

Pour l'activité antibactérienne, l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture issu du milieu MS additionné d'amidon s'est avéré le meilleur (30 mm contre *S. aureus* et 21 mm contre *B. subtilis*), suivie de celui issu du milieu additionné de glucose et enfin de maltose.

Cependant, les résultats montrent que les extraits méthanoliques de la biomasse mycélienne ne présentent aucune activité contre les germes-cibles testés.

1.3. Activités sur milieu MS + Amidon additionné de différentes sources d'azote

L'extraction des molécules bioactives produites par la souche PAL114 poussant sur milieu synthétique MS + amidon additionné de différentes sources d'azote a été effectuée à partir du surnageant de culture (en utilisant le dichlorométhane) et de la biomasse (en utilisant le méthanol), et ce, au jour de production optimale.

Les extraits des surnageant de culture et de la biomasse mycélienne ont été testés par antibiographie contre les germes-cibles.

Les résultats obtenus ont montré que l'activité de l'extrait au dichlorométhane du surnageant de culture du milieu MS additionné de DL-proline est la meilleure (32 mm contre *S. aureus* et 23 mm contre *B. subtilis*), suivie de celle du milieu additionné de L-leucine. Cependant, l'extrait obtenu du surnageant de culture issu du milieu additionné de L-tryptophane et les extraits méthanoliques de la biomasse mycélienne issus des milieux

additionnés de DL-proline et L-leucine ont montré une absence totale d'activité antibactérienne.

Tableau 10. Activités antibactériennes des extraits organiques du surnageant de culture et de la biomasse de la souche PAL114 ayant poussé sur différents milieux de culture (Tata, 2019).

Milieu de culture	Activité en (mm)		Couleur des extraits (séchés puis solubilisés dans 1 ml de méthanol)
	<i>Staphylococcus aureus</i> MRSA 639c	<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	
Surnageant de culture après extraction au dichlorométhane			
ISP2	25	16	Jaune vif
MS – glucose	25	13	Jaune vif
MS – maltose	12	8	Jaune clair
MS – amidon	30	21	Jaune vif
MS - DL-proline	32	23	Jaune vif
MS - L-leucine	19	10	Jaune vif
MS- L-tryptophane	-	-	Non coloré
Biomasse mycélienne après extraction au méthanol			
ISP2	17	11	Jaune vif
MS- L-tryptophane	22	13	Bleu foncé
MS+ autres sources d'azote	-	-	Non coloré
MS+ autres sources de carbone	-	-	Non coloré

- Le diamètre des disques (6 mm) est compris dans la mesure des activités. - = pas d'activité autour du disque.

2. Discussion

L'extraction des molécules bioactives a été effectuée avec le dichlorométhane qui s'est avéré être le meilleur solvant d'extraction des antibiotiques sécrétés par la souche PAL114, selon Aouiche (2011, 2013). Ces extraits ont été testés par antibiographie contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c et *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Ces derniers montrent une bonne activité antibiotique contre les germes-cibles.

Les différents extraits du surnageant provenant du milieu ISP2 et des milieux synthétiques additionnés des différentes sources de carbone ou d'azote étaient colorés en jaune et actifs contre *Staphylococcus aureus* et *Bacillus subtilis*, à l'exception du surnageant de culture issu du milieu MS-amidon + L-tryptophane qui était non coloré, et n'a montré aucune activité antimicrobienne, ce qui révèle une relation entre la couleur des extraits au dichlorométhane (couleur jaune) et la sécrétion des produits bioactifs. Ces résultats corrèlent avec ceux obtenus par Aouiche, 2013 par le fait que les antibiotiques sécrétés par cette souche sont de couleur jaune (saquayamycines A et C, chaetdoglobosine A et vinéomycine A1).

En effet, uniquement les extraits méthanoliques mycéliens issus du milieu ISP2 qui ont montré des activités antimicrobiennes contre les microorganismes testés ainsi que ceux issus du milieu MS-amidon + L-tryptophane, où nous avons remarqué que la biomasse mycélienne (initialement jaunâtre) est devenue bleu foncé. Il se pourrait que cette forte activité soit liée à cette couleur bleu foncé nouvellement apparue.

Par ailleurs, Aouiche (2013) a montré que l'extrait mycélien de la souche PAL114 présente une faible activité, dirigée uniquement contre *Candida albicans* M3.

De ce fait, Les antibiotiques produits par la souche PAL114 ne sont pas totalement sécrétés dans le milieu de culture, en effet, une partie active contre *S. aureus* MRSA 639c, *B. subtilis* ATCC 6633 et *Candida albicans* M3 reste à l'intérieur du mycélium.

D'une manière générale, les antibiotiques externes sont les mêmes que ceux qui sont internes (Zitouni, 2005; Badji, 2006; Lamari, 2006; Boudjella, 2007), mais dans certains cas, assez rares, ils peuvent être différents (Hacène *et al.*, 1994).

Conclusion

L'utilisation massive et répétée d'antibiotiques, tant chez l'homme que chez l'animal, a profondément modifié l'écologie bactérienne. En exerçant une pression de sélection sur les bactéries, la surconsommation d'antibiotiques a favorisé le développement de souches résistantes aux antibiotiques. Pour cela, plusieurs stratégies ont été mises en œuvre afin de mettre sur le marché de nouveaux antibiotiques (Goldman *et al.*, 1996; Jiang *et al.*, 2002). L'une d'elle vise à la recherche de souches appartenant à des genres d'actinomycètes notamment le genre *Streptomyces*.

Dans cette optique, la production d'antibiotiques par la souche PAL114 de *Streptomyces* sp a été étudiée, en s'intéressant à l'influence des sources de carbone et d'azote sur la production des molécules antibactériennes.

La souche *Streptomyces* sp. PAL114 (proche de l'espèce *Streptomyces griseoflavus*) est une nouvelle souche de *Actinobacteria* qui a été isolée par Aouiche (2011) et a été étudiée dans des travaux antérieurs par Aouiche (2013) et Tata (2019) où ils ont réussi à découvrir de nouvelles molécules, parmi lesquelles on note la mzabimycine A et mzabimycine B qui se sont avérées être actives uniquement contre les bactéries à Gram positif.

Le présent travail a permis d'aboutir dans un premier temps à montrer la bonne activité antibactérienne de la souche PAL 114 par la méthode des stries croisées. Des cinétiques de production ont été alors réalisées afin de rechercher un milieu de culture favorable à la production d'antibiotiques.

Les cinétiques de production ont d'abord été effectuées dans le milieu complexe ISP2, préconisé dans la littérature pour la production des antibiotiques par les actinobactéries. Une forte activité antibactérienne est observée sur ce milieu. D'autre part, nous avons montré l'effet de trois sources de carbone sur la production des antibiotiques dans le milieu MS additionné de DL-proline. La meilleure source de carbone s'est avérée être l'amidon, suivi du glucose puis le maltose. Par la suite, le milieu MS + amidon est utilisé afin de tester trois

sources d'azote. La DL-proline a permis d'obtenir une meilleure activité par rapport à l'ISP 2 et aussi par rapport à la L-leucine et le L-tryptophane.

Le milieu synthétique additionné d'amidon et la D-L proline s'est avéré être le milieu favorable à la production des antibiotiques par la souche PAL114 de *Streptomyces*.

Dans la même optique, Ababutain *et al.*, (2013) ont également étudié l'influence de glucose, maltose, amidon naturel et amidon soluble sur la biomasse et le rendement en antibiotiques de la souche *Streptomyces* sp. MS-266 Dm4 contre *Bacillus cereus*. La croissance maximale et la production d'antibiotiques ont été obtenues dans des cultures additionnées d'amidon soluble comme source de carbone.

Par ailleurs, Da Silva *et al.*, (2012), ont également utilisé la DL-proline, la L-leucine et le L-tryptophane comme sources d'azote à côté d'autres acides aminés, en vue d'étudier l'effet de certaines sources d'azote sur la production d'antibiotique chez trois souches de *Streptomyces spp* isolées à partir d'un échantillon de sol prélevé dans la région de Manaus, Amazonas, Brésil. Les meilleures sources d'azote sont avérées être la phénylalanine, le sulfate d'ammonium, l'asparagine et la peptone.

Par la suite, une extraction de molécules bioactives produites par la souche PAL114 poussant sur les différents milieux (ISP2 et MS) a été effectuée, au jour optimal de la production, à partir du surnageant de culture (en utilisant le dichlorométhane) et de la biomasse (en utilisant le méthanol). Ces extraits ont été testés par antibiographie contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c et *Bacillus subtilis* ATCC 6633. Ces derniers ont montré une bonne activité. De ce fait, les antibiotiques produits par la souche PAL114 ne sont pas totalement expulsés dans le milieu de culture, en effet, une partie active reste à l'intérieur du mycélium.

En conclusion, nous pouvons dire que la souche PAL114 de *Streptomyces* pourrait être une souche prometteuse en matière de production d'antibiotiques actifs contre *Staphylococcus aureus* MRSA 639c résistant à la méthicilline, l'espèce la plus fréquemment isolée des

prélèvements pathologiques chez l'Homme, et que la composition du milieu de culture influe fortement sur la production des composés antibactériens sécrétés par cette souche.

Notre travail n'est qu'une étude préliminaire sur la production d'antibiotiques par la souche PAL 114. Les perspectives qui découlent de ce présent travail sont multiples et les principales peuvent être résumées comme suit :

- Optimisation de la production des antibiotiques sur milieu MS + amidon avec DL-proline, en faisant varier la concentration de chaque composé.
- Purification des nouveaux produits et la détermination de leurs structures chimiques.
- Détermination de la concentration minimale inhibitrice (CMI) des antibiotiques purifiés.
- Etude de l'effet d'autres paramètres sur la production d'antibiotiques (autres sources nutritionnelles organiques, composés minéraux, oligo-élément, pH, température, aération, etc.)
- Augmentation du rendement et la modification de la régulation de la biosynthèse de l'antibiotique par voie génétique, chez la souche productrice s'avèrent nécessaires.

Références bibliographiques

A

Ababutain I. M., Aziz Z. K. A. and AL-Meshhen N. A. (2013). Optimization of environmental and nutritional conditions to improve growth and antibiotic productions by *Streptomyces* sp. Isolated from Saudi Arabia Soil. *Int. Res. J. Microbiol.* **4(8):**179-187.

Adrio J. L. and Demain A. L. (2010). Recombinant organisms for production of industrial products. *Landes Bioscience.* **1(2):** 116-131.

Anandan R., Dharumadurai D. and Manogaran G. P. (2016). An Introduction to Actinobacteria. *In: Actinobacteria-Basics and Biotechnological Applications.* 1–36.

Aouiche A. (2011). Recherche sur les actinomycètes des sols de Ghardaïa antagonistes de microorganismes pathogènes et toxigènes pour l’homme: isolement, taxonomie et caractérisation des molécules actives. Thèse de magister, Université Djillali Liabes, Sidi-bel-abbes. 127 p.

Aouiche A., Sabaou N., Meklat A., Zitouni A., Bijani C., Mathieu F. and Lebrihi A. (2012). *Saccharothrix* sp. PAL54, a new chloramphenicol-producing strain isolated from a Saharan soil. *World J. Microb. Biot.* **28** : 943-951.

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. 159 p.

Arasu M. V., Esmail G. A., Al-Dhabi N. A. and Ponmurugan K. (2016). Managing pests and diseases of grain legumes with secondary metabolites from actinomycetes. *In: Subramaniam G, Arumugam S, Rajendran V, eds. Plant Growth Promoting Actinobacteria.* 1–298.

Asselineau J. et Zalta J. P. (1973). Les antibiotiques: structure et exemples de mode d’action. Hermine, Paris. 364 p.

Augustine S. K., Bhavsar S. P. and Kapadnis B. P. (2005). Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK 39. *Indian J Med. Res.* **121:**164–170.

Aung M (1997). Criblage de nouvelles souches d'actinomycètes productrices d'antifongiques non-polyéniques. Production, extraction, purification et caractérisation des composés antimicrobiens biosynthétisés. Thèse de Doctorat de l'INP de Lorraine, France. 261 p.

B

Badji B. (2006). Étude de la taxonomie et des antibiotiques antifongiques de trois souches d'actinomycètes d'origine saharienne appartenant aux genres *Actinomadura* et *Nonomuraea*. Thèse de doctorat, université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 226 p.

Baoxin Z., Xiangjing W. and Wensheng X. (2011). Optimization of fermentation medium for enhanced production of milbemycin by a mutant of *Streptomyces bingchenggensis* BC-X-1 using response surface methodology. *African Journal of Biotechnology*. **10**: 7225–7235.

Barabás G., Vargha G., Szabó I. M., Penyige A., Damjanovich S., Szöllösi J., Matkó J., Hirano T., Mátyus A. and Szabó I. (2001). n-Alkane uptake and utilisation by *Streptomyces* strains. *Antonie van Leeuwenhoek*. **79**: 269–276.

Barabote R. D., Xie G., Leu D. H., Normand P., Necsulea A., Daubin V., Medigue C., Adney W. S., Xu X. C., Lapidus A., Parales R. E., Detter C., Pujic P., Bruce D., Lavire C., Challacombe J. F., Brettin T. S. and Berry A. M. (2009). Complete genome of the cellulolytic thermophile *Acidothermus cellulolyticus* 11B provides insights into its ecophysiological and evolutionary adaptations. *Genome Res*. **19** : 1033-1043.

Barka E. A., Vatsa P., Sanchez L., Gaveau-Vaillant N., Jacquard C., Klenk H. P., Clément C., Ouhdouch Y., van Wezel G. P. 2016. Taxonomy, physiology, and natural products of *Actinobacteria*. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **80**:1–43.

Barrett D. (2002). From natural products to clinically useful antifungals. *Biochimica Biophysica Acta*. **1587** : 224-233.

Battraud P. (2017). La résistance aux antibiotiques, un mythe ou une réalité. Thèse de doctorat, Université de Lille 2, Faculté des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques. 128 p.

Bentley S. D., Chater K. F., Cerdeño-Tárraga A. M., Challis G. L., Thomson N. R., James K. D., Harris D. E., Quail M. A. and Kieser H. (2002). Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor*A3(2). *Nature*. **417**: 141-147.

Berdy J., Aaszalos A. and Nitt K. L. M. (1987). CRC Handbook of antibiotic compounds. Microbial metabolites. vol 13. Parties 1, 2, 3. CRC Press, Boca Raton, Florida, USA. 1072 p.

Berdy J. (2005). Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot.* **58**: 1-26.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (2012) Whitman WB, Goodfellow M, Kämpfer P, Busse HJ, Trujillo ME, Ludwig W, Suzuki Ki, Parte A (Eds). Vol 5: The Actinobacteria. 2ème édition, Springer, New York. 1750 p.

Bhathena Z. P., Vora C. and Kadam K. (2002). Rapid bioremediation of phenolic effluent through use of actinomycal consortium. *Pollution Research.* **21**(3):265–275.

Boubetra D. (2013). Nouvelles espèces de *Saccharothrix* isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par *Saccharothrix* sp. SA198. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba. 159p.

Boudjella H. (2007). Etude taxonomique et des propriétés antagonistes des *Streptosporangium* des sols sahariens. Caractérisation des principaux antibiotiques secrétés par ces derniers. Thèse de Doctorat, institut National Agronomique, El-Harrach, Alger. 188 p.

Bouras N. (2005). Régulation de la production d'antibiotiques dithiopyrrolones chez *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. Thèse de Doctorat, école nationale supérieure agronomique, Toulouse. 238 p.

Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006a). Effect of amino acids containing sulfur on dithiopyrrolone antibiotic productions by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *J. Appl. Microbiol.* **100**: 390-397.

Bouras N., Mathieu F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2006b). Nutritional requirements for the production of dithiopyrrolone antibiotics by *Saccharothrix algeriensis* NRRL B-24137. *Enzyme and Microbial Technology.* **39**: 1423–1429.

Box S., Cole M. and Yeoman G. (1973). Prasinons A and B: Potent insecticides from *Streptomyces prasinus*. *Applied microbiology.* **26**: 699–704.

Breton A., Theilleux J., Sanglier J. J. and Vobi G. (1989). Organismes producteurs: biologie, taxonomie et écologie. In: *Biotechnologie des antibiotiques*. Larpent J. P. et Sanglier J. J. (Eds.). Paris, Masson, pp. 33-70.

Brown D. E. and Zainudeen M. A. (1978). Effect of inoculum size on the aeration pattern of batch cultures of a fungal microorganism. *Biotechnol. Bioeng.* **20** : 1045-1061.

Bugnicourt M., (1995). Dictionnaire de microbiologie générale: la vie racontée par les bactéries, ellipses (Eds), pp. 991.

Bull A. T. and Stach J. E. (2007). Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *Trends Microbiol.* **15**: 491-9.

C

Carattoli A. (2009). Resistance plasmid families in *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents.Chemother.* **53** (6): 2227-2238.

Castillo U .F., Strobel G. A., Ford E. J., Hess W. M., Porter H., Jensen J. B., Albert H., Robison R., Condrón M. A., Teplow D. B., Stevens D. and Yaver D. (2002). Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by *Streptomyces* NRRL 30562, endophytic on *Kennedia nigricans*. *Microbiology.* **148**: 2675- 2685.

Cattoir V. et Daurel C. (2009). Revue générale: quelles nouveautés en antibiothérapie ? Update on antimicrobial chemotherapy. *Médecine et maladies infectieuses* **40**: 135-154.

Chater KF. (1998). Taking a genetic scalpel to the *Streptomyces* colony. *Microbiology.* **3**: 1465–1478.

Cho S. S., Choi Y. H., Simkhada J. R., Mander P., Park D. J. and Yoo J. C. (2012). A newly isolated *Streptomyces* sp. CS392 producing three antimicrobial compounds. *Bioprocess and Biosystems Engineering.* **35**: 247–254.

Collignon P. C., Conly J. M., Andremont A., McEwen S. A., Aidara-Kane A., Agerso Y., Andremont A., Collignon P. and Conly J. (2016). World Health Organization ranking of antimicrobials according to their importance in human medicine: a critical step for developing risk management strategies to control antimicrobial resistance from food animal production. *Clinical Infectious Diseases* **63**: 1087-1093.

D

Da Silva I. R., Martins M. K., Carvalho C. M., de Azevedo J. L. and Procopio R. E. d. L. (2012). The Effect of Varying Culture Conditions on the Production of Antibiotics by *Streptomyces* spp. *Ferment. Technol.* **1**:105 .

Deacon J. W. (1984). Introduction to modern mycology. Vol.7, 2nd.Ed., 239 p.

Delaunay S., Rondags E. et Germain P. (2003). Production d'antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires. génie de la réaction chimique J6008(1-12).

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

Demain, A. L (2006). From natural products discovery to commercialization: a success story. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **33**:486–495.

Driche E. (2010). Recherche des *Streptomyces* actifs contre quelques bactéries pathogènes multirésistantes aux antibiotiques. Mémoire de Magister en Microbiologie, ENS Kouba, Alger.

Dulaney E. L. (1948). Observations on *Streptomyces griseus* II. Nitrogen sources for growth and streptomycin production. *J. Bacteriol.* **56**: 305-313.

E

Eckwall E. C. and Schottel J. L. (1997). Isolation and characterization of an antibiotic produced by the scab disease-suppressive *Streptomyces diastatochromogenes* strain PonSSII. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology.* **19**: 220–225.

Elattal N. A., Hamdy A. A., Ali A. E. and Amin M. A. (2011). Nystatin Production by a Local *Streptomyces* sp. Isolated from Egyptian Soil. *J. Pharm. Biomed. Sci.* **1**(6): 128-136.

Elibol M. (2002). Product shifting by controlling medium pH in immobilised *Streptomyces coelicolor*A3(2) culture. *Process Biochem.* **37**(12): 1381-1386.

El-Naggar M. Y. (1991). Antibiotic production by some mutants of *Streptomyces nasri*. M.Sc.Thèse de doctorat.Alexandria University. Faculté de Science. Egypt.

El Sayed O. H., Asker M. M.S., Swelim M. A., Abbas I. H., Attwa A. I. and El Awady M. E. (2016). Production of hydroxy marilone C as a bioactive compound from *Streptomyces badius*. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*. **14**: 161–168.

Essien J. P. and Udosen E. D. (2000). Distribution of actinomycetes in oil contaminated ultisols of the Niger Delta (Nigeria). *J. Environ. Sci.* **12**(3):296–302.

Eucast (2013). European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. www.eucast.org
Site Web visité en juin 2020.

F

Falzone M., Crespo E., Jones K., Khan G., Korn V. L., Patel A., Patel M., Patel K., Perkins C., Siddiqui S., Stenger D., Yu E., Gelber M., Scheffler R., Nayda V., Ravin A., Komal R., Rudolf J. D., Shen B., Gullo V. and Demain A. (2017). Nutritional control of antibiotic production by *Streptomyces platensis* MA7327: importance of l-aspartic acid. *The Journal of Antibiotics*. **70**: 828–831.

Flatt P. M., Wu X., Perry S. and Mahmud T. (2013). Genetic insights into pyralomicin biosynthesis in *Nonomuraea spiralis* IMC A-0156. *J. Nat. Prod.* **76**:939–946.

G

Garrityb G. M., Bell J. and Lilburn T. G. (2004). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology .Vol. 4. Williams and Wilkins Co., Baltimore.

Genilloud O., Gonzalez I., Alazar O., Martin J. and Vicente F. (2010). Current approaches to exploit actinomycetes as a source of novel natural products. *J. Ind. Microbiol Biotechnol.*

Goldman D. A., Weinstein R. A., Wenzel R. P., Tablan O. C., Duma R. J., Gaynes R. P., Schlosser J. and Martone W. J. (1996). Strategies to prevent and control the emergence and spread of antimicrobial-resistant microorganisms in hospital: a challenge to hospital leadership. *J. A. M. A.*, **275**:234-240.

Goodfellow M. and Williams S. T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann. Rev. Microbiol* **37**:189–216.

Goodfellow M., Mordarski M. and Williams S. T. (1984). Biology of the actinomycetes.

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.

Goodfellow M., Whitman W., Kämpfer P., Busse H., Ludwig W., Trujillo M. and Suzuki K. (2012). Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (G et Al., Ed.). Springer New York Dordrecht Heidelberg London.

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

Goudjal Y., Toumatia O., Sabaou N., Barakate M., Mathieu F. and Zitouni A. (2013). Endophytic actinomycetes from spontaneous plants of Algerian Sahara: indole-3-acetic acid production and tomato plants growth promoting activity. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. **29**: 1821–1829.

Gupta R., Saxena R. K., Chaturvedi P. and Viridi J. S. (1995). Chitinase production by *Streptomyces viridificans*: its potential in fungal cell wall lysis. *Journal of Applied Bacteriology*. **78**: 378–383.

Gupta R. S. (2011). Origin of diderm (Gram-negative) bacteria: antibiotic selection pressure rather than endosymbiosis likely led to the evolution of bacterial cells with two membranes. *Antonie van Leeuwenhoek*. **100** (2): 171-182.

Gupte M., Kulkarni P. and Ganguli B. N. (2002). Antifungal antibiotics. *Appl Microbiol Biotechnol*. **58**: 46-57.

H

Ha S., Lee K., Lee S.(2017). Optimization of herbicidin A production in submerged culture of *Streptomyces scopuliridis* M40. *Journal of microbiology and biotechnology*. **27**: 947.

Hacène H., Sabaou N., Bounaga N. and Lefebvre G. (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare *Actinomycetales*. *Microbios*. **79**:81–85.

Hamaki T., Suzuki M., Fudou R., Jojima Y., Kajiura T., Tabuchi A., Sen K. and Shibai H. (2005). Isolation of novel bacteria and actinomycetes using soil-extract agar medium. *J. Biosci. Bioeng.*, **99**:485-492.

Hamm, P. S., Caimi, N. A., Northup, D. E., Valdez, E. W., Buecher, D. C., Dunlap, C. A., Labeda, D. P., Lueschow, S. and Porras-Alfaro, A. (2017). Western bats as a reservoir of novel *Streptomyces* species with antifungal activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **83**.

Harada K., Kurono Y., Nagasawa S., Oda T., Nasu Y., Wakabayashi T., Sugimoto Y., Matsuura H., Muranaka S., Hirata K. and Okazawa A. (2017). Enhanced production of nojirimycin via *Streptomyces ficellus* cultivation using marine broth and inhibitory activity of the culture for seeds of parasitic weeds. *Journal of Pesticide Science.* **42**: 1–6.

Harir, M., Bellahcene, M., Baratto, M. C., Pollini, S., Rossolini, G. M., Trabalzini, L., Fatarella, E. and R. Pogni (2018). Isolation and characterization of a novel tyrosinase produced by Sahara soil actinobacteria and immobilization on nylon nanofiber membranes. *J. Biotechnol.* **10**: 54-64.

Hasani A., Kariminik A. & Issazadeh K. (2014). *Streptomyces*: Characteristics and their antimicrobial activities. *International journal of Advanced Biological and Biomedical Research.* **2**: 63–75.

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

Hodgson D. A. (2000). Primary metabolism and its control in *Streptomyces*: a most unusual group of bacteria. *Adv. Microb. Phys.* **42**: 47-238.

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

Hopwood DA. (2007). *Streptomyces* in nature and medicine: the antibiotic makers. Oxford University Press, New York.

Hosoya Y, Adachi H, Nakamura H, Nishimura Y, Naganawa H, Okami Y & Takeuchi T. (1996). The structure of diphenazithionin, a novel antioxidant from *Streptomyces griseus* ISP 5236. *Tetrahedron Letters*. **37**: 9227–9228.

Hug J. J., Chantal D. B., Maja R., Katarina C. and Rolf M. (2018). Concepts and Methods to Access Novel Antibiotics from *Actinomycetes*. *Antibiotics*. **7**(44).

I

Igarashi M, Kinoshita N, Ikeda T, Kameda M, Hamada M & Takeuchi T. (1997). Resormycin, a novel herbicidal and antifungal antibiotic produced by a strain of *Streptomyces platensis*. I. Taxonomy, production, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. **50**: 1020–1025.

J

Janso JE, Carter GT (2010). Biosynthetic potential of phylogenetically unique endophytic actinomycetes from tropical plants. *Appl. Environ. Microbiol.*, **76**:4377–4386.

Jeon BJ, Kim JD, Han JW & Kim BS. (2016). Antifungal activity of rimocidin and a new rimocidin derivative BU16 produced by *Streptomyces mauvecolor* BU16 and their effects on pepper anthracnose. *Journal of Applied Microbiology*. **120**: 1219–1228.

Jiang B., Bussey H. and Roemer T. (2002). Novel antiviral agent: a medicinal plant perspective. *J. Appl. Microbiol.*, **95**: 412-427.

Jiang Y., Chen X., Lou K., Mao P. (2013). Cultivable soil actinomycete communities in some areas of western China. *Acad. J. Biotechnol.*, **1**(1):1–13.

Jose P.A.E et Jebakumar S.R.D. (2013). Non-streptomycete actinomycetes nourish the current microbial antibiotic drug discovery. *Front Microbi.*, **4**: 240.

Jose P.A., Santhi V.S. and Jebakumar SRD (2011). Phylogenetic-affiliation, antimicrobial potential and PKS gene sequence analysis of moderately halophilic *Streptomyces* sp. inhabiting an Indian saltpan. *J. Basic Microbiol.*, **51**:348–356.

K

Kämpfer P., Kroppenstedt R. M. and Wolfgang D. (1991). A numerical classification of the genera *Streptomyces* and *Streptoverticillium* using miniaturized physiological tests. *Journal of General Microbiology*. **137**: 1831–1891.

Kämpfer P. (2012). Genus I. *Streptomyces* Waksman and Henrici 1943. In: Goodfellow A et al (eds) Bergey's manual of systematic bacteriology. 5th edn. Springer, New York, 1455–1767.

Kämpfer P., Glaeser S. P., Parkes L., van Keulen G. and Dyson P. (2014). The family *Streptomycetaceae*. In: Rosenberg E, DeLong E, Lory S, Stackebrandt E, Thompson F (ed), The prokaryotes. Springer Verlag, Heidelberg, Germany.

Kemung H. M., Tan L. T. H., Khan T. M., Chan K.-G., Pusparajah P., Goh B. H. and Lee L. H. (2018). *Streptomyces* as a Prominent Resource of Future Anti-MRSA Drugs. *Front. Microbiol.* **9**: 2221.

Kim K. J., Kim M. A. and Jung J. H. (2008). Antitumor and antioxidant activity of protocatechualdehyde produced from *Streptomyces lincolnensis* M-20. *Archives of Pharmacal Research*. **31**: 1572–1577.

L

Labeda D. P., Goodfellow M., Brown R., Ward A. C., Lanoot C., Vannanneyt M., Swings J., Kim S. B., Liu Z., Chun J., Tamura T., Oguchi A., Kikuchi T., Kikuchi H., Nishii T., Tsuji K., Yamaguchi Y., Tase A., Takaha S. M., Sakane T., Suzuki K. I. and Hatano K. (2012). Phylogenetic study of the species within the family *Streptomycetaceae*. *Antonie van Leeuwenhoek*. **101**: 575-581.

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. Antibiotics*. **55**: 702-706.

Lamari L. (2006). Production de nouveaux antibiotiques du groupe des pyrrothines par une nouvelle espèce d'actinomycète, *Saccharothrix algeriensis*. Thèse de Doctorat d'Etat, Université Mouloud Mammeri de Tizi Ouzou. 186 p.

Larpent J. P. and Sanglier J. J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Edition Masson: 496p.

Larpent J. P. and Larpent-Gaurgaud M. (1997). Memento technique de microbiologie. Edition Lavoisier., 1039 p.

Laskin A.I. and Lechevalier H. (1984). Handbook of Microbiology.Vol.3, CRC Press.

Lassami A. (2015). Effet de quelques sources nutritionnelles sur la production d'antibiotiques par la souche SA198 de *Saccharothrix* sp. En milieu de culture semi-synthétique. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger.96 p.

Laurent F. J., Provost F. and Boiron P. (1999). Rapid identification of clinically relevant *Nocardia* species to genus level by 16S rRNA gene PCR. *J. Clin. Microbiol.*, **37**: 99-102.

Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G. and Marinelli F. (2001). Rare genera of actinomycetes as potential producers of new antibiotics. *Antonie van Leeuwenhoek.* **78**: 399-405.

Lebrihi A., Lefebvre G. et Germain P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephalosporin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl. Microbiol.Biotechnol.*, **28**: 44-51.

Lechevalier M. P., De-bievre C., Lechevalier H. A. (1977). Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes: phospholipid composition. *Biochem. Syst. Ecol.*, **5**:249–260.

Lechevalier M. P. (1981).Ecological associations involving actinomycetes. *In: Shaal et Pulverer (Eds). Actinomycetes. Zbl. Bakt. Suppl.*, **11**:159–166.

Li J., Zhang H., Zhang S., Zhang J., Chen A., Wang J. and Xiang W. (2017).New 5-oxomilbemycins from a genetically engineered strain *Streptomyces bingchenggensis* BCJ60. *Records of Natural Products.* **11**: 431–438.

Lounès A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. et Germain P. (1996).Regulation of spiramycin synthesis in *Streptomyces ambofaciens*: Effect of glucose and inorganic phosphate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **45**: 204-211.

Lu S., Xie B., Liu B., Lu B. and Xing D. (2019). Neglected effects of inoculum preservation on the Start-Up of psychrophilic bioelectrochemical systems and shaping bacterial communities at low temperature. *Frontiers in Microbiology*. **10**: 935.

M

Mallié M. and Bastide J. M. (2001). Les nouveaux antifongiques et leurs stratégies de recherche. *Revue Française des Laboratoires*. **332**: 63-70.

Manikkam R., Venugopal G., Ramasamy B. and Kumar V. (2015). Effect of critical medium components and culture conditions on antitubercular pigment production from novel *Streptomyces* sp D25 isolated from Thar desert , Rajasthan. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*. **5**: 15–19.

Manivasagan P., Venkatesan J., Sivakumar K. and Kim S. K. (2013). Marine actinobacterial metabolites: Current status and future perspectives. *Microbiological Research*. **168**: 311–332.

Mann J. (2001). Natural products as immunosuppressive agents. *Nat. Prod. Rep.*, **18**:417–430.

Mason M. G., Ball A. S., Reeder B. J., Nicholls P., Wilson M. T. and Silkstone G. (2001). Extracellular heme peroxidases in *Actinomycetes*: a case of mistaken identity. *Applied and Environmental Microbiology*. **67**: 4512–4519.

Martens J. H., Barg H., Warren M. and Jahn D. (2002). Microbial production of vitamin B12. *Applied Microbiology and Biotechnology*. **58**: 275–285.

Mechlinski W. (1978) The polyene antifungal antibiotics. *In*: Laskin AI, Lechevalier HA (Eds). Handbook of microbiology. Vol 3. CRC Press. pp.93–107.

Mellouli L., Ben Ameer-mehdi R., Sioud S., Salem M. and Bejar S. (2003). Isolation , purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated *Streptomyces* sp . US24 strain. *Research in Microbiology*. **154**: 345–352.

Mellouli L., Karray-Rebai I., Sioud S., Ben Ameer-Mehdi R., Naili B., Bejar S. (2004). Efficient transformation procedure of a newly isolated *Streptomyces* sp. TN58 strain producing antibacterial activities. *Current Microbiology*. **49**(6):400–406.

Mohamed S. H., Galal A. M. (2005). Identification and antiviral activities of some halotolerant *Streptomyces* isolated from Qaroon Lake. *Int. J. Agr. Biol.*, **5**:747–753.

Moncheva P., Tishkov S., Dimitrova N., Chipeva V., Antonova-Nikolova S., Bogatzevska N. (2002). Characteristics of soil actinomycetes from antarctica. *Journal Cult. Collect.*, **3**:3–14.

Mora-Duarte, J., Betts, R., Rotstein, C., Colombo, A. L., Thompson-Moya, L., Smietana, J., Lupinacci, R. and Sable, C. (2002). Comparison of caspofungin and amphotericin B for invasive candidiasis. Caspofungin invasive candidiasis study group. *N. Engl. J. Med.*, **347**(25): 2020-2029.

Moreira K. A., Albuquerque B. F., Teixeira M. F. S., Porto A. L. F., Lima J. L. (2002). Application of protease from *Nocardioopsis* sp. as a laundry detergent additive. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **18**:307– 312.

Moulin M. et Coquerel A. (1998). Pharmacologie, connaissances et pratique. 2ème édition, Masson. Paris.

N

Nakae K., Kurata I., Kojima F., Igarashi M., Hatano M., Sawa R., Kubota Y., Adachi H. and Nomoto A. (2013). Sacchathridine A, a prostaglandin release inhibitor from *Saccharothrix* sp. *J. Nat. Prod.*, **76**: 720–722.

Nithya K., Muthukumar C., Biswas B., Alharbi N. S., Kadaikunnan S., Khaled J. M. and Dhanasekaran, D. (2018). Desert actinobacteria as a source of bioactive compounds production with a special emphases on Pyridine-2, 5-diacetamide a new pyridine alkaloid produced by *Streptomyces* sp. DA3-7. *Microbiological Research.* **207**: 116-133.

Normand P., Lapierre P., Tisa L.S., Gogarten J. P., Alloisio N., Bagnarol E., Bassi C. A., Berry A. M., Bickhart D. M., Choisine N., Couloux A., Cournoyer B., Cruveiller S., Daubin V., Demange N., Francino M. P., Goltsman E., Huang Y., Kopp O. R., Labarre L., Lapidus A., Lavire C., Marechal J., Martinez M., Mastronunzio J. E., Mullin B. C., Niemann J., Pujic P., Rawnsley T., Rouy Z., Schenowitz C., Sellstedt A., Tavares F., Tomkins J. P., Vallenet D., Valverde C., Wall L. G., Wang Y., Medigue C. and Benson

D. R. (2007). Genome characteristics of facultatively symbiotic *Frankia* sp. strains reflect host range and host plant biogeography. *Genome Res.*, **17**: 7–15.

Novikova L. M. and Makarevich V. G. (1984). Inter-relationship of dehydrogenase activity of mycelium of *Streptomyces aureofaciens* and its capacity for tetracycline biosynthesis. *Antibiotiki*, **29**: 735-740.

O

Ohta N., Park Y. S., Yahiro K. and Okabe M. (1995). Comparison of neomycin production from *Streptomyces fradiae* cultivation using soybean oil as the sole carbon source in an air-lift bioreactor and a stirred-tank reactor. *J. Ferment. Bioeng.*, **79**(5): 443-448.

Okoro C. K., Brown R., Jones A. L., Andrews B. A., Asenjo J. A., Goodfellow M., Bull A. T. (2009). Diversity of culturable actinomycetes in hyper-arid soils of the Atacama Desert, Chile. *Antonie van Leeuwenhoek*. **95**:121–133.

Oskay M. (2011). Effects of some environmental conditions on biomass and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp., KGG32. *International Journal of Agriculture & Biology*. **13**: 317-324.

Otoguro M., Tamura T., Suzuki K. I. and Hayakawa M. (2009). *Saccharothrix violaceirubra* sp. nov., isolated from soil and plant litter. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **59**: 1504-1507.

P

Pandey B.P., Roh C., Choi K.Y., Lee N., Kim E.J., Ko S., Kim T., Yun H. and Kim B.G. (2010). Regioselective hydroxylation of daidzein using P450 (CYP105D7) from *Streptomyces avermitilis* MA 4680. *Biotechnology and Bioengineering*. **105**: 697–704.

Parente E. C., Brienza C., Moles M. and Ricciardi A. (1995). A Comparison of methods for the measurement of bacteriocin activity. *J. Microbiol. Meth.*, **22**: 95-108.

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

Phillips R.W., Wiegel J., Berry C.J., Fliermans C., Peacock A.D., White D.C. and Shimkets L.J. (2002). *Kineococcus radiotolerans* sp. nov., a radiation-resistant, gram-positive bacterium. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **52**:933–938.

Prasad M. P. (2015). Optimized bioreactor techniques in the production and purification of tetracycline from ‘*Streptomyces aureofaciens*. *World journal of pharmaceutical research.* **4**: 1349-1357.

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

Procópio R. E. d. L., Silva I. R. d., Martins M. K., Azevedo J. L. d. and Araújo J. M. d. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *braz.j infect dis.* **16**(5): 466-471.

Q

Qi X., Wang X., Ren H., Zhang F., Zhang X., He N., Guo W., Chen R., Xie Y., and He Q. (2017). NC1404, a novel derivative of Bleomycin with modified sugar moiety obtained during the preparation of Boningmycin. *The Journal of Antibiotics.* **70**: 970–973.

R

Rafieenia R. (2013). Effect of nutrients and culture conditions on antibiotic synthesis in Streptomycetes. *Asian Journal of Pharmaceutical and Health Sciences.* **3**: 810-821.

Ranjani A., Dhanasekaran D., et Gopinath P. M. (2016). An Introduction to Actinobacteria. In Actinobacteria - Basics and Biotechnological Applications. InTech. Pp 3-38.

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

Raytapadar S. and Paul A. K. (2001). Production of an antifungal antibiotic by *Streptomyces aburaviensis* IDA-28. *Microbiol. Res.*, **155**: 315 – 323.

Rezenka T., Klanova K., Podojil M. and Vanek Z. (1984). Fatty acids of *Streptomyces cinnamomensis*, producer of monensin. *Folia Microbiol* **29**:217.

S

Sabaou N., Amir H. et Bounaga N. (1980). Le palmier dattier et la fusariose. X. Dénombrement des actinomycètes de la rhizosphère: leur antagonisme vis-à-vis du *Fusarium oxysporum* f. sp. *albedinis*. *Ann. Phytopathol.*, **12**:253–257.

Sabaou N., Boudjella H., Bennadji A., Mostefaoui A., Zitouni A., Lamari L. et Bennadji H. (1998). Les sols des oasis du Sahara algérien, source d'actinomycètes, rares producteurs d'antibiotiques. *Sécheresse*. **9**(2):147–153.

Sabaou N., Hacène H., Bennadji A., Bennadji H. et Bounaga N. (1992). Distribution quantitative et qualitative des actinomycètes dans les horizons de sol de surface et profonds d'une palmeraie algérienne. *Can. J. Microbiol.*, **38**:1066–1073.

Saha S., Dhanasekaran D., Shanmugapriya S. and Latha S. (2013). *Nocardioopsis* sp. SD5: A potent feather degrading rare actinobacterium isolated from feather waste in Tamil Nadu, India. *Journal of Basic Microbiology*. **53**: 608–616.

Sarkar S., Saha S. and Debashis R. (2008). Enhanced Production of Antimicrobial Compounds by Three Salt-Tolerant Actinobacterial Strains Isolated from the Sundarbans in a Niche-Mimic Bioreactor. *Mar. Biotechnol.* **10**:518–526.

Sathya A., Vijayabharathi R. and Gopalakrishnan S. (2017). Plant growth-promoting Actinobacteria: a new strategy for enhancing sustainable production and protection of grain legumes. *Biotech.* **7**: 102.

Schatz A., Bugle E. and Waksman S. A. (1944). Streptomycin, a Substance Exhibiting Antibiotic Activity Against Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*. **55**: 66-69.

Sekurova O.N, Zhang J, Kristiansen K.A and Zotchev S.B. (2016). Activation of chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae* ATCC 10712 by ethanol shock: insights from the promoter fusion studies. *Microbial Cell Factories*. **15**: 85.

Selvakumar J. N., Chandrasekaran S. D. and Vaithilingam M. (2015). Bio Prospecting of Marine- Derived *Streptomyces Spectabilis* VITJS10 and Exploring Its Cytotoxicity against Human Liver Cancer Cell Lines. *Pharmacognosy Magazine*. **11**(44).

Shapiro S. et Vining L.C. (1985). Effect of ammonium on chloramphenicol production by *Streptomyces venezuelae* in batch and continuous culture. *Can. J. Microbiol.*, **31**, 119-123.

Shirling B. and Gottlieb D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int. J. Syst. Bacteriol.* **16**(3): 3313-3340.

Singh B.P., Rateb M.E., Rodriguez-Couto S., Polizeli M. d. L. T. d. M. and Wen-Jun L. (2019). Editorial: Microbial Secondary Metabolites: Recent Developments and Technological Challenges. *Frontiers in Microbiology.* **10**(914).

Singh N. and Rai V. (2012). Optimization of cultural parameters for antifungal and antibacterial metabolite from microbial isolate; *Streptomyces rimosus* MTCC 10792 from soil of Chhattisgarh. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences.* **4**: 94–101.

Singh Saharan B., Grewal A. and Kumar P. (2014). Biotechnological Production of Polyhydroxyalkanoates: A Review on Trends and Latest Developments. *Chinese Journal of Biology.* **2014**: 1–18.

Smaoui S. (2010). Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat. Université de Toulouse. France. 181p.

Smith G.M. and Calam C.T. (1980). Variations in inocula and their influence on the productivity of antibiotic fermentations. *Biotechnol. Lett.*, **2**, 261–266.

Solanki R., Khanna M., Lal R. (2008). Bioactive compounds from marine actinomycetes. *Indian J. Microbiol.* **48**:410–431.

Solecka J., Zajko J., Postek M. and Rajnisz A. (2012). Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes. *Open Life Sciences.* **7**: 373–390.

Souagui Y., Tritsch D., Grosdemange-Billiard C. and Kecha M. (2015). Optimization of antifungal production by an alkaliphilic and halotolerant actinomycete, *Streptomyces* sp. SY-BS5, using response surface methodology. *Journal of Medical Mycology.* **25**: 108–115.

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

Strub C., Brandam C., Meyer X. and Lebrihi A. (2008). Investigations of *Saccharothrix algeriensis* growth on synthetic media. *Journal of bioscience and bioengineering*. **106**: 148–153.

Strub C., Brandam C., Meyer X. and Lebrihi A. (2010). A stoichiometric reaction scheme for *Saccharothrix algeriensis* growth and thiolutin production. *Process Biochem*. **45**: 1808–1815.

T

Takahashi E., Kimura T., Nakamura K., Arahira M. and Iida M. (1995). Phosphonothrixin, a novel herbicidal antibiotic produced by *Saccharothrix* sp. ST-888. I. Taxonomy, fermentation, isolation and biological properties. *The Journal of Antibiotics*. **48**: 1124–9.

Takahashi Y., Omura S. (2003). Isolation of new actinomycete strains for the screening of new bioactive compounds. *J. Gen. Appl. Microbiol*. **49**(3):141–154.

Tamura S., Park Y., Toriyama M. and Okabe M. (1997). Change of mycelial morphology in tylosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J. Ferment. Bioeng*. **83**(6): 523-528.

Tata S. (2015). Effet des sources de carbone et d'azote sur la production d'antibiotiques par *Streptomyces* sp. PAL114 en milieu synthétique. Magister de Microbiologie, E.N.S. de Kouba, Alger. 128 p.

Tata S. (2019). Production d'antibiotiques par *Streptomyces* sp. PAL114 en fonction des sources d'azote et de carbone, mise en évidence de nouvelles molécules et activités biologiques. Thèse de doctorat, Ecole Normale Supérieure de Kouba. 72 p.

Teniola O.D., Addo P.A., Brost I.M., Färber P., Jany K.D., Alberts J.F., Van Zyl W.H., Steyn P.S. and Holzappel W.H. (2005). Degradation of aflatoxin B1 by cell-free extracts of *Rhodococcus erythropolis* and *Mycobacterium fluoranthenorans* sp. nov. DSM44556T. *International Journal of Food Microbiology*. **105**: 111–117.

Thakur D., Bora T.C., Bordoloi G.N. and Mazumdar S. (2009). Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by *Streptomyces* sp. 201. *Journal of Medical Mycology*. **19**: 161–167.

Tiwari K. and Gupta R.K. (2011). Rare *actinomycetes*: a potential storehouse for novel Antibiotics. *Crit. Rev. Biotechnol.* **32**: 108-132.

Tiwari K., Gupta R.K. (2013). Diversity and isolation of rare *actinomycetes*: an overview. *Crit. Rev. Biotechnol.* **39**:256–294.

Touati A., Benallaoua S., Forte D., Madoux J., Brasme L. and Champs C. D. (2006). First report of CTX-M-15 and CTX-M-3 beta-lactamases among clinical isolates of *Enterobacteriaceae* in Bejaia, Algeria. *Int. J. Antimicrob. Agents*. **27**: 397-402.

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

Toumatia O., Yekkour A., Goudjal Y., Riba A., Coppel Y., Mathieu F., Sabaou N. and Zitouni A. (2014). Antifungal properties of an actinomycin D-producing strain, *Streptomyces* sp. IA1, isolated from a Saharan soil. *Journal of Basic Microbiology*. **55**: 221–228.

Tremblay Y. D. N., Hathroubi S. et Jacques M. (2014). Les biofilms bactériens: leur importance en santé animale et en santé publique. *The Canadian Journal of Veterinary Research*. **78**: 110–116.

U

Untrau S., Lebrihi A., Lefebvre G. et Germain P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr. Microbiol.*, **28**,111-118.

V

Valan Arasu M., Duraipandiyar V., Agastian P. et Ignacimuthu S. (2008). Antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-26 recovered from western Ghats of Tamil Nadu. *J. Mycol. Méd.*, **18**, 147-153.

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

Van Dissel D. and Wezel G. P. v. (2017). Morphology-driven downscaling of *Streptomyces lividans* to micro-cultivation. *Antonie van Leeuwenhoek*. 1-13.

Viaene T., Langendries S., Beirinckx S., Maes M. and Goormachtig S. (2016). *Streptomyces* as a plant's best friend?. *FEMS microbiology ecology*. **92**: 1–42.

W

Wadetwar R.N., Chaturvedi J.L., Building Z. and Road H. (2013). Production of antibiotic from *actinomycetes* isolated from Nagpur. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. **4**: 3094-3098.

Waksman S.A. (1945). Microbiological antagonism and antibiotic substances. The Commonwealth Fund. New York.

Waksman S.A. (1953). Streptomycin: background, isolation, properties, and utilization. *Science*. **118**: 259–66.

Waksman S.A. and Henrici A.T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J. Bacteriol*. **46**: 337-341.

Waksman S.A. and Woodruff H.B. (1940). Bacteriostatic and Bactericidal Substances Produced by a Soil *Actinomycetes*. *Proceedings of the society for Experimental Biology and Medicine*. **45**: 609-614.

Wang X., Huang L., Kang Z., Buchenauer H. and Gao X. (2010). Optimization of the fermentation process of *actinomycete* strain Hhs.015. *Journal of biomedicine & biotechnology*. **2010**: 1–10.

Wang X.J., Zhang J., Wang J.D., Qian P.T., Liu C.X. and Xiang W.S. (2013). Novel cyclopentenone derivatives produced by a rare actinobacterial strain *Actinoalloteichus nanshanensis* sp. nov. *Nat Prod Res*.

Williams S.T. (1978). *Streptomyces* in the soil ecosystem. In: Mordarski M, Kurylowicz W, Jeljaszewicz (Eds). *Nocardia and Streptomyces*. Fischer-Verlag G, Stuttgart. pp. 137–144.

Williston E.H., Zia-Walrath P. and Youmans G.P. (1947). Plate methods for testing antibiotic activity of actinomycetes against Virulent human type Tubercle Bacilli. *J. Bacteriol.*, **54**, 563-568.

Z

Zhang D.C., Schumann P., Redzic M., Zhou Y.G., Liu H.C., Schinner F. and Margesin R. (2012). *Alpinus* sp. nov., a psychrophilic actinomycete isolated from alpine glacier cryoconite. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **62**:445–450.

Zhao G.Z., Li J., Huang H.Y., Zhu W.Y., Zhao L.X., Tang S.K., Xu L.H. and Li W.J. (2011). *Pseudonocardia artemisiae* sp. nov., isolated from surface-sterilized *Artemisia annua* L. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **61**:1061–1065.

Zheng Y., Saitou A., Wang C.M., Toyoda A., Minakuchi Y., Sekiguchi Y., Ueda K., Takano H., Sakai Y., Abe K., Yokota A. and Yabe, S. (2019). Genome Features and Secondary Metabolites Biosynthetic Potential of the Class *Ktedonobacteria*. *Frontiers in Microbiology.* **10**: 893.

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

Zitouni A., Mathieu F., Coppel Y., Pont F., Sabaou N. and Lebrihi A. (2004). Mutactimycin PR, a new anthracycline antibiotic from *Saccharothrix* sp. SA 103: II. Physico-chemical properties and structure elucidation. *The journal of antibiotics.* **57**: 373-378.