

**BADJI MOKHTAR -ANNABA
UNIVERSITY
UNIVERSITE BADJI MOKHTAR
ANNABA**



**جامعة باجي مختار
- عنابة -**

Faculté des Sciences

Département de Biochimie

THESE

Présentée en vue de l'obtention du diplôme de
DOCTORAT EN MICROBIOLOGIE

**Isolement et identification de souches d'Actinomycètes
Productrices de molécules Bioactives au niveau du lac Oubeira :
Etude morphologique, physiologique,
moléculaire et spectre d'activité**

Option : Microbiologie Appliquée

Par
M^{elle} HOUDA MORAKCHI

Devant le jury

PRESIDENT :	N. ABBACI	Prof.	U.B.M. ANNABA
RAPPORTEUR	D. GACEMI-KIRANE	Prof.	U.B.M. ANNABA
EXAMINATEUR :	H. CHITTIBI	Prof.	U.B.M. ANNABA
EXAMINATEUR :	D. BENOURETH	Prof.	U.GUELMA
EXAMINATEUR :	N. COCHET	Prof.	UTC. COMPIEGNE (France)

Année Universitaire 2010 / 2011

Remerciements

Que les membres du jury qui ont bien voulu consacrer une partie de leur temps à juger ce travail trouvent ici l'expression de toute ma reconnaissance.

Madame le professeur Nafissa Abbaci-Boutefnouchet pour avoir, bien voulu me faire l'honneur de présider ce jury.

Madame le professeur Djamila Gacemi-Kirane qui a permis la réalisation de ce travail ; j'ai apprécié sa disponibilité, l'autonomie et la confiance qu'elle m'a accordée, son implication constante tout le long de cette thèse ainsi que pour toute la rigueur scientifique qu'elle m'a prodiguée quand elle me faisait défaut.

Madame le professeur Houria Chitibbi, pour avoir accepté de faire partie du jury et me faire l'honneur de critiquer ce travail.

Madame le professeur Nelly Cochet de l'Université de Technologie de Compiègne d'une part pour m'avoir accueilli dans son laboratoire pendant 18 mois et d'autre part pour sa disponibilité et son aide dans la réalisation de ce travail. Je la remercie d'avoir accepté d'être membre de ce jury.

Monsieur le professeur Djamel Benouareth de l'université de Guelma, pour m'avoir fait l'honneur de participer à la commission d'examen et de juger ce travail.

J'associe à mes remerciements toute l'équipe « Activités Microbienne et Bioprocédés » du laboratoire de « Transformations Intégrées de la Matière renouvelable » EA 4297, pour leur accueil chaleureux au cours des nombreux mois passés ensembles. Je citerai tout particulièrement : Mr André Pauss directeur du laboratoire, Mr Maurice Nonus et mes amis Mira taok et Cindy Barillot.

A ma famille, spécialement mes parents, pour m'avoir toujours soutenue et permis d'aller aussi loin ; je tiens à les remercier de façon toute particulière.

A toute l'équipe du laboratoire de Microbiologie du département de Biochimie de l'université Badji-Mokhtar pour leur soutien morale et leurs encouragements.

A toute personne ayant contribué de près ou de loin à la réalisation de cette thèse.

Sommaire des figures

Figures	Titre	Pages
Figure 1	Carte géographique du lac Oubeira	4
Figure 2	Cycle de développement du genre <i>Streptomyces</i> .	23
Figure 3	Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes : (RF) : <i>Rectus flexibilis</i> , (RA) : <i>Retinaculum apertum</i> , (S) : <i>Spira</i> , (MA) : <i>Mycelium aérien</i> , (MS) : <i>Mycelium du substrat</i> , (bv) : biverticillé, (mv) : monoverticillé, (s) : sporophore, (c.sp) : Chaîne de spore, (sp.i) : spores isolées, (sp.m) : spores mobiles, (sg) : sporange.	25
Figure 4	Dendrogramme simplifié relatant les clusters taxonomiques du genre <i>Streptomyces</i> utilisant la taxonomie numérique.	26
Figure 5	Macroscopie des isolats après 14 jours d'incubation à 30°C sur milieu ISP ₂ . A : WLN-001 ; B : SLO-014 ; C : WLO-016 ; D : SLN-021 ; E : SLO-036 ; F : SLN-041 ; G : WLN-051 ; H : WLO-059 ; I : WLO-084 et J : SLO-105.	34
Figure 6	Microscopie électronique (ESEM) des isolats après 14 jours d'incubation à 30°C sur milieu ISP ₂ . A : WLN-001 ; B : SLO-014 ; C : WLO-016 ; D : SLN-021 ; E : SLO-036 ; F : SLN-041 ; G : WLN-051 ; H : WLO-059 ; I : WLO-084 et J : SLO-105.	35
Figure 7	Amplification du gène 16S rDNA à partir des échantillons d'ADN extraits des souches sélectionnées. 1 : Marqueur de poids moléculaire. Echelle 1 kb DNA ladder (Invitrogen) ; 2 : ADN souche WLN-001 ; 3 : ADN souche SLO-105 ; 4 : ADN souche SLO-014 ; 5 : ADN souche WLO-016 ; 6 : ADN souche SLN-021 ; 7 : ADN souche SLO-036 ; 8 : ADN souche SLN-041 ; 9 : ADN souche WLN-051 ; 10 : ADN souche WLO-059 et 11 : ADN souche WLO-084.	38
Figure 8	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> WLN-001 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.	40
Figure 9	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> SLO-014 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.	41
Figure 10	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> WLO-016 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.01 substitutions par nucléotides position.	43
Figure 11	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> SLN-021 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.	44

Figure 12	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> SLO-036 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.002 substitutions par nucléotides position.	46
Figure 13	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> SLN-041 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.	47
Figure 14	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> WLN-051 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.	49
Figure 15	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> WLN-059 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.	51
Figure 16	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> WLO-084 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.	52
Figure 17	Arbre phylogénique de <i>Streptomyces sp</i> SLO-105 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.	54
Figure 18	Produits naturels connus mis en évidence dans les extraits du genre <i>Streptomyces</i> .	61
Figure 19	Spectre d'activité des <i>Streptomyces</i> isolés.	67
Figure 20	Cinétique de croissance et de production de <i>Streptomyces</i> WLO-001 sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.	68
Figure 21	Cinétique de croissance et de production de <i>Streptomyces</i> SLN-021 sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm	69
Figure 22	Cinétique de croissance et de production de <i>Streptomyces</i> SLN-041 sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.	70
Figure 23	Cinétique de croissance et de production de <i>Streptomyces</i> SLO-105 sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.	71
Figure 24	Cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens par WLO-001 en culture batch réalisée en biofermenteur sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.	72

Figure 25	Cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens par SLN-041 en culture batch réalisée en biofermenteur sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.	72
Figure 26	Cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens par SLO-105 en culture batch réalisée en biofermenteur sur milieu ISP ₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.	73
Figure 27	Effet de la source de carbone sur la croissance et la l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces</i> WLO-001 sur milieu de base additionné de NaNO ₃ comme source d'azote.	75
Figure 28	Effet de la source de carbone sur la croissance et la l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces</i> SLN-041 sur milieu de base additionné de NaNO ₃ comme source d'azote.	75
Figure 29	Effet de la source de carbone sur la croissance et la l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces</i> SLO-105 sur milieu basal additionné de NaNO ₃ comme source d'azote.	76
Figure 30	Effet de la source d'azote sur la croissance et la l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces</i> WLO-001 sur milieu de base additionné de Fructose comme source de carbone.	77
Figure 31	Effet de la source d'azote sur la croissance et la l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces</i> SLN-041 sur milieu de base additionné de Fructose comme source de carbone.	77
Figure 32	Effet de la source d'azote sur la croissance et la l'activité antibactérienne de <i>Streptomyces</i> SLO-105 sur milieu de base additionné de mannitol comme source de carbone.	78
Figure 33	Transition électronique en spectrophotométrie UV-Visible.	87
Figure 34	Mode de vibration moléculaire.	88
Figure 35	Spectre d'absorption UV-Visible des fractions méthanoliques des <i>Streptomyces</i> isolées.	91
Figure 36	Spectre FTIR en KBR de la fraction F-001 extraite des <i>Streptomyces</i> WLO-001.	92
Figure 37	Spectre FTIR en KBR de la fraction F-041 extraite des <i>Streptomyces</i> SLN-041.	93
Figure 38	Spectre FTIR en KBR de la fraction F-105 extraite des <i>Streptomyces</i> SLO-105.	94

Sommaire des tableaux

Tableaux	Titre	Pages
Tableau 1	Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires.	27
Tableau 2	Codes, origine et aspect des isolats sélectionnés.	30
Tableau 3	Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats sélectionnés sur milieux ISP solides.	31-32
Tableau 4	Caractéristiques physiologiques des isolats.	37
Tableau 5	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> SLO-014 et espèces apparentées.	42
Tableau 6	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> WLO-016 et espèces apparentées.	43
Tableau 7	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> SLN-021 et espèces apparentées.	45
Tableau 8	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> SLO-036 et espèces apparentées.	46
Tableau 9	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> SLN-041 et espèces apparentées.	48
Tableau 10	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> WLN-051 et espèces apparentées.	50
Tableau 11	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> WLO-059 et espèces apparentées.	51
Tableau 12	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> WLO-084 et espèces apparentées.	53
Tableau 13	Caractéristiques morphologiques et physiologiques de <i>Streptomyces sp</i> SLO-105 et espèces apparentées.	55
Tableau 14	Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs (2002).	60
Tableau 15	Maxima d'absorbance de chromophores élémentaires en spectroscopie UV. Visible.	87
Tableau 16	Table de corrélation simplifiée en Infra Rouge.	89
Tableau 17	Rapport frontal des différentes fractions observées en CCM des filtrats de culture des <i>Streptomyces</i> isolées.	90
Tableau 18	Fréquences vibrationnelles (cm ⁻¹) observées chez les différentes fractions étudiées.	95

Liste des abréviations

ADN: Acide desoxyribonucléique

ADNr: Acide desoxyribonucléique ribosomal.

ATCC : American Type Culture Collection.

CCM: Chromatographie sur couche mince.

CFU : Colonie Forming Unit : Unité Formant Colonie.

DMSO: Diméthylsulfoxyde.

DO : Densité optique.

EDTA: Acide éthylène diamine tétra acétique

EtBr : Bromure d'éthidium.

FTIR : Fournier Transformed Infra Red

KH₂PO₄ Dihydrogénophosphate de potassium

KBr : Bromure de Potassium.

ISP : International *Streptomyces* Project.

IR: Rayonnement infrarouge.

MS: Masse sèche.

NCCLS: National Committee for Clinical Laboratory Standard.

OMS : Organisation Mondiale de la Santé.

PCR: «Polymerase Chain Reaction », Amplification en chaîne par polymérase.

PO₂ : pression en Oxygène.

Rf: Rapport frontal.

rpm : rotation par minute.

TBE : Tris Borate EDTA.

TE : Tris-EDTA.

Tris: Trishydroxyméthylaminométhane

UV: Rayonnement ultraviolet

Sommaire

Introduction générale	1
Matériels et Méthodes	4
I. Obtention du matériel biologique.	4
1. Coordonnées géographiques et présentation du site de prélèvement.	4
2. Echantillonnage.	5
2.1. Caractéristiques physicochimique.	5
2.2. Techniques de prélèvement, de transport et de conservation.	5
2.2.1. Eau.	5
2.2.2. Sédiment.	5
3. Mise en culture.	6
4. Isolement des actinomycètes	6
5. Conservation des isolats.	6
5.1. Conservation de courte durée.	7
5.2. Conservation longue durée.	7
5.2.1. Préparation de la suspension de spores.	7
5.2.2. Conservation des spores.	7
II. Macro et micromorphologie des Isolats.	7
1. Caractérisation culturales.	7
2. Microscopie.	8
2.1. Microscopie électronique.	8
III. Physiologie des isolats.	8
1. Utilisation des glucides.	8
1.1. Préparation de l'inoculum.	9
1.2. Ensemencement et lecture.	9
2. Production de pigments mélanoides.	10
3. Dégradation du Tween 80.	10
4. Dégradation de l'Adénine, Guanine et Tyrosine.	10
5. Dégradation de l'amidon.	10
6. Dégradation de la gélatine.	10
7. Dégradation de la caséine.	11
8. Production de lecithinases.	11
9. Dégradation de la chitine.	11
10. Croissance à différentes températures.	11
11. Activité hémolytique.	11
12. Hydrolyse de l'hydrogène sulfuré.	11
13. Croissance à différentes concentration en NaCl.	12
IV. Identification moléculaire.	12
1. Extraction de l'ADN génomique.	12
1.1. Préparation du gel d'agarose.	12
1.2. Préparation du dispositif d'électrophorèse.	13
1.3. Mise en place de l'électrophorèse.	13
2. Polymérase Chain Réaction (PCR)	14
2.1. Purification des produits PCR.	14
3. Séquençage.	15
V. Activités antimicrobienne et cinétique de croissance et de	16

production.	
1. Test de l'activité.	16
1.1. Technique de la double souche.	16
2. Cinétique de croissance et production en Erlenmeyer.	16
2.1. Méthodes analytiques.	17
2.1.1. Estimation de la biomasse.	17
2.1.2. Calcul des paramètres cinétique de croissance.	17
2.1.3. Test d'activité sur les microorganismes cibles.	18
3. Culture en biofermenteur.	18
4. Effet de la source de carbone et d'azote.	19
VI. Extraction et caractérisation partielle des métabolites produits.	20
1. Culture en milieu liquide.	20
2. Extraction par des solvants.	20
3. Techniques chromatographique.	20
3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM).	20
4. Techniques spectrophotométries.	21
4.1. Spectrophotométrie UV-Visible.	21
4.2. Spectrophotométrie Infrarouge.	21
Chapitre 1.	22
I. Introduction.	22
II. Résultats.	29
1. Obtention du matériel biologique et conservation des isolats.	29
2. Macro et micromorphologie des isolats.	30
2.1. Morphologie et caractéristiques culturelles.	30
2.2. Micromorphologie.	33
3. Physiologie des isolats.	36
4. Identification moléculaire.	38
4.1. Extraction, amplification et BLAST.	38
4.2. Phylogénie.	39
III. Discussion.	56
Chapitre 2.	60
I. Introduction.	60
II. Résultats.	65
1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne.	65
1.1. Choix des microorganismes cible.	65
1.2. Test de l'activité antimicrobienne.	67
2. Cinétique de croissance et de production.	67
2.1. Essai de culture en Erlenmeyer.	67
2.2. Culture en bioréacteur.	71
3. Effet de la source de carbone et d'azote.	74
3.1. Effet de la source de carbone.	74
3.2. Effet de la source d'azote.	76
III. Discussion.	79
Chapitre 3.	85
I. Introduction.	85
II. Résultats.	90
1. Extraction et purification.	90

2. Spectroscopie.	90
2.1. Spectroscopie UV-Visible.	91
2.2. Spectroscopie Infrarouge.	91
III. Discussion.	97
Conclusion et perspectives	99
Résumés	103
Références bibliographiques.	105

Introduction générale

Introduction

Les produits naturels issus du métabolisme de microorganismes constituent l'une des principales sources des bioindustries de fermentation dans diverse domaine. Reconnu comme des agents performants de transformation, de dégradation et de production de plusieurs métabolites d'intérêt, les microorganismes sont largement exploités en biotechnologies pour la production de plusieurs métabolites primaires et secondaires ayant des valeurs ajoutées et des activités biologiques très importantes. Parmi ces molécules, on peut citer les alcools, les acides organiques, les acides aminés, les polysaccharides, les vitamines, les enzymes, les antibiotiques, les antifongiques etc. [Demain, 2000].

Dans la recherche pharmaceutique, les produits naturels jouent un rôle important en raison de leur diversité chimique et leur large éventail d'activités biologique. En effet, selon Newman *et al.* (2003) 80% des médicaments utilisés dans le traitement de diverses maladies sont d'origine naturelle ; dont près de 62 % de molécules anticancéreuse et 78 % d'anti-infectieux utilisés en thérapeutique courante.

Depuis la découverte de la Pénicilline par Alexandre Fleming en 1928, les antibiotiques ont eu un immense impact dans le traitement d'infections causés par des micro-organismes pathogènes. Cependant, l'antibiothérapie abusive, l'automédication ainsi que leur utilisation intensive en agriculture à conduit à l'émergence de nouvelles souches bactérienne multi-résistantes aux antibiotiques. Il en résulte qu'à l'heure actuelle aucune classe d'antibiotiques ; aussi bien d'origine naturelles que synthétique; n'échappent à ce phénomène. En effet, des études ont démontré en moyenne l'existence d'un intervalle de quelques années entre les premiers essais cliniques les premiers cas de résistance observés [Fernandez *et al.*, 2011]. Ce phénomène d'antibiorésistance est particulièrement observé en milieu hospitalier où, selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), il y aurait chaque jour un million d'infections de type nosocomial dans le monde.

Sous l'effet de la demande croissante de nouvelles molécules bioactives efficaces sur ces bactéries multi-résistantes la recherche et le développement de nouveaux produits doués d'activités physiologiques nouvelles a été propulsé au rang des défis les plus importants pour l'humanité au 21^{ème} siècle. Les chercheurs estiment que seul 1% des microorganismes vivants sur terre a été découvert ce qui laisse place à la découverte de multitude de nouvelles espèces et souches microbiennes encore inconnues et qui doivent posséder des métabolismes particuliers et différents et donc la capacité de produire de nouvelles molécules.

Les produits naturels bioactifs sont essentiellement bio synthétisés par des microorganismes filamenteux [Tamura *et al.*, 1997]. Parmi ces derniers, une famille de bactéries filamenteuse s'est particulièrement illustrée par la richesse de son métabolisme secondaire et par la remarquable diversité des métabolites produits [Overbye et Barrett, 2005]. Le genre *Streptomyces*, appartenant à cette famille, produit plus des tiers des antibiotiques utilisés dans la médecine moderne [Kieser *et al.*, 2000]. L'histoire des antibiotiques issus de ce genre débute en 1940 avec la découverte de l'Actinomycine par Waksman et Woodruff, suivie

en 1944 par la Streptomycine, premier agent antituberculeux [Omura, 1986]. Entre 1955 et 1962, près de 80% des antibiotiques découverts appartenait à la famille des actinomycètes, avec une large contribution du genre *Streptomyces* [Watve et al., 2001].

Les techniques moléculaires basées sur le séquençage du génome, ont permis de mettre en évidence le potentiel biosynthétique des espèces appartenant au genre *Streptomyces*. L'analyse de leur génome a révélé qu'ils possédaient 5 à 10 fois plus de voies de biosynthèse que ce qui avait été observé d'après leurs capacités biosynthétiques [Lautru et al., 2005]. Cet énorme potentiel, pourrait conduire à la production de nouveaux métabolites secondaires avec des structures différentes et par conséquent des activités biologiques différentes. Il existe donc un réservoir immense et non exploité de diversité métabolique au sein des milliers d'espèces appartenant à la famille des actinomycètes et plus particulièrement, du genre *Streptomyces*.

Dans l'espoir d'augmenter la probabilité de découverte de nouveaux métabolites bioactifs d'intérêt à partir de ces microorganismes, le moyen le plus utilisé est le moyen naturel qui consiste à les rechercher à partir de niche écologique longtemps ignorées et/ou peu étudiées tel que les écosystèmes marins et littoraux, les zones humides et les lacs.

Dans cette étude, nous nous sommes proposés d'explorer les activités d'actinomycètes isolées au niveau des eaux et sédiments du lac Oubeira. Le choix du lac connu par sa richesse floristique, faunistique et sylvoicole a été dicté par son importance géographique qu'écologique, ce dernier fait partie du complexe de zones humides le plus important du Maghreb (le Parc National d'EL-KALA). Ces écosystèmes particuliers constituent des milieux riches en microorganismes et dont la biodiversité revêt une importance majeure. La caractérisation de la biodiversité des populations microbiennes dans ces milieux ne revêt pas uniquement une importance écologique, elle permet également la sélection de souches à potentiel biotechnologique élevé et leur exploitation dans divers domaines.

Dans cette thématique, l'objet de ce travail de thèse a été :

- L'isolement d'actinomycètes végétant au niveau des eaux et sédiments du lac Oubeira.
- La mise en évidence de leurs caractéristiques physiologiques et leurs activités de biodégradation.
- L'établissement de leur taxonomie du point de vue moléculaire et phylogénétique.
- La mise en évidence de leurs activités antimicrobiennes vis-à-vis de bactéries, moisissures et levures utilisés comme cibles.
- L'étude de leur cinétique de croissance et de production en cultures submergée en mode Fed-Batch et l'influence des sources de carbone et d'azote sur leur croissance et la production de métabolites bioactifs.
- L'extraction et la caractérisation partielle des métabolites bioactifs produits.

La partie isolement et caractérisation physiologique de cette thèse a été réalisée au niveau du département de Biochimie de l'université Badji-Mokhtar Annaba. L'identification moléculaire et les cinétiques de croissance et de production de métabolites bioactifs ainsi que la microscopie électronique ont été effectués au niveau du laboratoire de Transformations Intégrées de la Matière Renouvelable (TIMR) - EA 4297, équipe « Activités Microbiennes et Bioprocédés » (MAB) de l'université de Technologie de Compiègne (UTC) France. L'analyse chimique en Infrarouge a quant à elle été effectuée au département de Chimie Organique de l'Université Badji-Mokhtar-Annaba.

Matériels et Méthodes

I. Obtention du matériel biologique :

1. Coordonnées géographiques et présentation du site de prélèvement :

Le lac Oubeira est situé dans la partie occidentale du complexe humide d'El Kala à N 36°51'55", S 8°25'10", E 36°49'40", O 8°21'20". Il est classé deuxième plan d'eau du Parc National car il est le plus profond des lacs d'eaux douces [Grimes, 2005].

Ce lac d'eau douce endoréique se présente sous forme subcirculaire, avec une profondeur maximale autour de 4 mètre 20. Il contient un volume d'eau de 32.535.096,80 m³, avec une profondeur moyenne de 1 mètre 24. Son fond est constitué d'une première couche de vase dont le substrat est entièrement composé d'argile de Numidie et qui constitue le toit à une profondeur moyenne de 1.30, la valeur maximale étant de 2.50 m. Le bassin versant d'une superficie de 9919,35 ha alimente le site par quatre oueds dont le plus important, le Messida au Sud-est, recueille les eaux de crues de l'oued EL Kébir. En été, ce système hydrologique fonctionne dans le sens inverse. La pluviométrie annuelle moyenne est de 700 à 800 mm et l'évaporation est de 74.15 mm avec un maximum de 152,08 mm et un minimum de 22.47 mm. Le lac présente une végétation essentiellement constituée d'halophytes, de scirpes, de roseaux, de châtaignes d'eau et de nénuphar jaune. Il est classé « zone humide d'importance internationale rare dans la région méditerranéenne » par la convention RAMSAR (1982)[Boumezbeur et Ameur, 2002] [Fig.1].

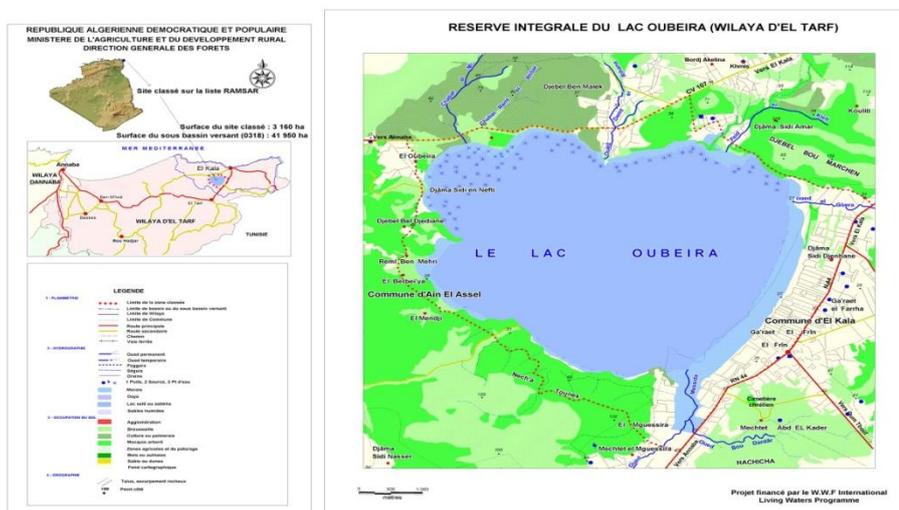


Figure 1. Carte géographique du lac Oubeira.

2. Echantillonnage :

2.1. Caractéristiques physicochimiques :

Les prélèvements d'échantillons d'eau et de sédiments ont été réalisés au niveau du lac Oubeira. Lors de l'échantillonnage quelques paramètres physico-chimiques des eaux du lac ont été mesurés à l'aide d'un multi-paramètre portable.

Les moyennes données au niveau des différents points de prélèvements révèlent une température de 19°C qui constitue une température de saisons (l'échantillonnage a été réalisé début Octobre) et un pH légèrement alcalin à 7.8 qui pourrait être expliquée par l'activité biologique de la macrovégétation immergée [El-Blidi *et al.*, 2006].

La conductivité électrique est de 408 μ S/cm, sachant que cette dernière renseigne sur l'état de minéralisation globale de l'eau (quantité de sel dissous), nos échantillons se situent dans un intervalle de minéralisation moyenne (entre 333 et 833 μ S/cm). [Rodier, 2005]

Nous notons également une teneur en oxygène dissous relativement faible de 6.3mg/l. La teneur en oxygène dissous dans les eaux superficielles doit être proche de la saturation (entre 9 et 11mg/ml) [Rodier, 2005]. Cette diminution est, en majeure partie, liée à la consommation de ce gaz dissous par les bactéries aérobies qui décomposent la matière organique s'accumulant à cet endroit. Or, cette accumulation de matière organique est proportionnelle à la quantité de matière vivante produite par le milieu lacustre qui meurt et sédimente au fond du lac. Ce phénomène de la diminution plus ou moins progressive des quantités d'oxygène dissous en profondeur, au cours des années, et associé à l'augmentation de la production biologique du milieu aquatique et constitue le reflet le plus évident de l'eutrophisation d'un lac [Lacaze, 1998].

2.2. Techniques de prélèvement, de transport et de conservation :

2.2.1. Eau : Le prélèvement des échantillons d'eau a été réalisé manuellement. Les échantillons sont prélevés dans des flacons de 5 litres propres rincés plusieurs fois avec l'eau à analyser puis fermés hermétiquement sans laisser de bulles d'air dans les flacons.

2.2.2. Sédiment : Les échantillons de sédiments ont été collectés à l'aide d'un préleveur de sédiment en vinyle (core de 10 cm de diamètre.) préalablement stérilisé avec de l'alcool. Le carottier est stérilisé à l'alcool avant l'échantillonnage à chaque station. La partie centrale de l'échantillon de sédiment large de 2 cm est recueillie à l'aide d'une spatule. Chaque échantillon est transféré dans un sac en polyéthylène propre, puis transporté immédiatement au laboratoire dans une glacière.

Les échantillons d'eau et de sédiments sont soigneusement étiquetés puis conservés à 4°C jusqu'à utilisation.

3. Mise en culture des souches :

La mise en culture est réalisée sur différents milieux spécifique aux actinomycètes :

Glycérol- asparagine agar (ISP₅) en g/l d'eau distillée : glycérol : 10; L-Asparagine : 1 ; K₂HPO₄ : 1; MgSO₄ : 0,5 ; 1 ml d'une solution saline (FeSO₄. H₂O : 1, MnCl₂.4H₂O : 1, ZnSO₄.7H₂O : 1); Agar : 15. pH : 7.0-7.4

Amidon-caséine agar en g/l d'eau distillée : amidon : 10 ; caséine : 0.3 ; NaNO₃ : 2 ; NaCl : 2; MgSO₄.7H₂O ; 0.05 ; CaCO₃ : 0.02; FeSO₄.7H₂O : 0.01; K₂HPO₄ : 2 ; agar : 15. pH : 7.0-7.5

Milieu de Gause en g/l d'eau distillée : KNO₃ : 1, K₂HPO₄ : 0.5 ; MgSO₄.7H₂O : 0.5 ; NaCl : 0.5; FeSO₄.7H₂O : 0.01 ; amidon : 20 ; agar 30. pH : 7.4

Les techniques de mise en cultures varient selon le type d'échantillon :

Echantillon d'eau : Après une série de dilution au 1/10, 1ml de chaque dilution est étalé à la surface des milieux gélosés coulés en boîtes de Petri à l'aide d'un râteau stérile.

Echantillon de sédiments : Un gramme de sédiments est mis en suspension dans 50 ml d'eau physiologique stérile. Après agitation, une série de dilution est réalisée et l'ensemencement est effectué comme décrit ci-dessus.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 10 à 15 jours.

4. Isolement des actinomycètes :

Pour chaque colonie présentant les caractéristiques morphologique des actinomycètes, une ömse de mycélium est prélevée puis ensemencée dans une boîte de Petri renfermant le milieu Extrait de levure-extrait de malt-agar (ISP₂: extrait de levure 4 g/l ; extrait de malt 10 g/l ; glucose 4 g/l ; agar 15 g/l ; pH 7.3). L'incubation se fait à 30°C pendant 10 à 15 jours. Les souches pures ainsi obtenues sont conservés en vue de leur identification.

5. Conservation des isolats :

Deux modes de conservation ont été utilisés :

5.1. Conservation de courte durée :

Les bactéries sont ensemencées sur gélose ISP₂ inclinée en tubes. Après la durée d'incubation, les tubes sont conservés à température ambiante. Cette technique permet la conservation des souches sur une durée de quelques semaines.

5.2. Conservation longue durée :

La méthode utilisée est celle des **Stock spores** qui permet la conservation longue durée des souches sous forme de spores bactériennes maintenues en suspension dans de la paraffine.

5.2.1. Préparation de la suspension de spores :

Les bactéries sont mises en culture sur milieu ISP₂ avec une incubation de 10 jours à 30°C (obtention d'une bonne sporulation). Après la période d'incubation, 10 ml d'eau distillée stérile sont ajoutés à la surface du milieu gélosé. À l'aide de billes en verre stériles, la surface des colonies est raclée doucement pour décoller les spores. La suspension de spores est ensuite prélevée à l'aide d'une pipette pasteur, introduite dans un tube Falcon stérile puis vortexée pendant 1 min à haute vitesse. Après agitation, la suspension de spores est filtrée dans une seringue stérile préalablement munie d'un coton stérile. Le filtrat est recueilli dans un nouveau tube puis centrifugé à 3000 g pendant 10 min. Le surnageant est éliminé puis remplacé par un volume égal d'eau distillée stérile [Hopwood *et al*, 1985]. La suspension de spores est diluée à l'aide d'eau distillée stérile jusqu'à obtenir une densité optique (DO) = 0.05 (environ une concentration de 10⁷ CFU/ml) à une longueur d'onde $\lambda=450\text{nm}$ [Hopwood *et al*, 1985].

5.2.2. Conservation des spores :

Un volume égal de glycérol stérile est ajouté à la suspension de spores qui est ensuite répartie dans des tubes de conservation (cryotubes) sous forme d'aliquotes de 1 ml. La conservation a été réalisée à -20°C et -80°C [Hopwood *et al*, 1985].

II. Macro et micromorphologie des isolats :

1. Caractéristiques culturelles :

Les caractéristiques morphologiques et culturelles des différents actinomycètes isolés ont été étudiés conformément aux directives de l'International *Streptomyces* Project (ISP) [Shirling *et* Gottlieb, 1966] et Bergey's manual of systematic bacteriology [Cross, 1989]. Les souches sont ensemencées sur les milieux : Extrait de levure-tryptone-agar (ISP₁), Extrait de levure-extrait de malt-agar (ISP₂), Farine d'avoine-agar (ISP₃), Sels inorganique-amidon-agar (ISP₄) et Glycérol-asparagine-agar (ISP₅).

La composition des milieux (g/l) est comme suit :

ISP₁ : extrait de levure 3 g ; tryptone 5 g ; agar 15 g. pH : 7.0-7.3

ISP₃ : farine d'avoine 20 g ; 1ml d'une solution saline; agar 15 g. pH : 7.2

ISP₄: Amidon soluble 10 g; K₂HPO₄ 1g; MgSO₄ 1g; NaCl 1g ; (NH₄)₂ SO₄ : 2g ; CaCO₃: 2g ; 1 ml d'une solution saline ; Agar 15 g. pH : 7.0-7.4

L'observation est réalisée après 14 jours d'incubation à 30°C. L'examen des souches se fait à l'aide d'un binoculaire et de nombreux paramètres tel que : la couleur du mycélium aérien, la couleur du mycélium du substrat, la présence ou absence de sporulation et la production de pigments (diffusible ou non dans le milieu) sont notés. L'attribution d'un code couleur a été effectué selon Kenneth (1958).

2. Microscopie :

2.1. Microscopie optique :

L'examen microscopique des bactéries a été effectué à l'aide d'un microscope optique à trois grossissements (X10, X40 et X100). Les observations sont réalisées directement sur boîtes de Petri pour permettre l'étude « in-situ » des mycéliums sans altération de leur structure.

2.2. Microscopie électronique :

L'examen de la structure fine des bactéries a été réalisé au moyen d'un microscope électronique à balayage : PHILIPS XL 30 ESEM (Environmental scanning electron microscopy) pourvu de la capacité d'étudier les échantillons en mode environnemental, c'est-à-dire sans traitement de métallisation préalable. Ce mode permet l'observation directe des structures dans leur état naturel hydraté ou vivant.

III. Physiologie des isolats :

L'étude physiologique des bactéries a porté sur : utilisation des glucides, la dégradation de composés organiques : l'adénine, guanine, tyrosine, caséine, tween 80, gélatine, l'amidon et chitine...etc, la production de pigments mélanoides et d'hydrogène sulfuré, la croissance à différentes températures, la croissance en présence de différentes concentration d'NaCl et l'activité hémolytique.

1. Utilisation des glucides :

L'utilisation des glucides a été vérifiée sur milieu **ISP₉** (KH₂PO₄ 2,38g/l ; (NH₄)₂SO₄ 2,64 g/l ; MgSO₄ 1g/l ; K₂HPO₄ 5,65g/l ; 1 ml d'une solution saline : CuSO₄.5H₂O 6,4g/l, FeSO₄.7H₂O 1,1g/l, MnCl₂.4H₂O 7,9g/l, ZnSO₄.7H₂O 1,5g/l ; Agar 15 g/l. pH : 6.8-7.0) selon la méthode décrite par Pridham et Gottlieb (1948).

Les glucides testés sont : Fructose, Saccharose, Mannitol, Xylose, Sorbitol, Arabinose, Ribose, Lactose et Glycérol. Les sources de carbones sont stérilisées par filtration et ajoutés au milieu juste avant inoculation. Deux contrôles sont réalisés à chaque fois : un control positif avec le glucose comme source de carbone et un control négatif sans source de carbone [Pridham et Gottlieb, 1948].

1.1. Préparation de l'inoculum :

A partir d'une culture de la bactérie sur milieu ISP₁ liquide pendant 2 à 3 jours sous agitation permanente de 100 rpm, 5 à 10 ml de culture sont prélevés dans un tube de centrifugation stérile. La suspension est centrifugée à 5500 g pendant 15 min, le surnageant est éliminé et remplacé par un volume égal d'eau stérile pour restaurer le volume initial. La suspension est re-centrifugée à 5500 rpm pendant 15 min. L'opération de lavage est répétée trois fois, puis le culot est récupéré pour servir d'inoculum.

Remarque : Le culot doit être utilisé dans un délai de 3 heures maximum.

1.2. Ensemencement et lecture :

Les bactéries testées sont ensemencées par stries sur milieu ISP₉ contenant une seule source de carbone. Les boîtes sont examinées à 10 et 16 jours et comparées aux contrôles positif et négatif. Les résultats sont notifiés comme suit :

Utilisation positive (+) : La croissance sur la source test est significativement plus élevée que celle obtenue sur le milieu dépourvu de glucide, mais légèrement inférieure à celle avec le glucose.

Utilisation douteuse (±) : La croissance sur la source test est significativement plus élevée que celle obtenue sur le milieu dépourvu de glucide, mais significativement inférieure à celle avec le glucose.

Utilisation négative (-) : La croissance est similaire à celle obtenue avec le milieu dépourvu de glucides.

2. Production de pigments mélanoides :

La production de pigments mélanoides par les bactéries est examinée sur les milieux : Peptone-fer-extrait de levure-agar (**ISP₆** : Peptone 20 g/l, Citrate ferrique d'ammonium 0,5g/l, K₂HPO₄ 1g/l, Thiosulfate de sodium 0,08g/l, extrait de levure 1 g/l, Agar 15 g/l. pH : 7.0-7.2) et Tyrosine-agar (**ISP₇** : glycérol 15 g/l ; L-Asparagine 1g/l ; L-Tyrosine 0,5g/l ; K₂HPO₄ 0,5g/l ; MgSO₄ 0,5 g/l ; NaCl 0,5g/l ; FeSO₄ 0,01g/l ; Agar 15 g/l. pH : 7.2-7.4). Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un halo noir autour des colonies.

3. Dégradation du Tween 80 :

La dégradation du Tween 80 a été observée sur le milieu de Sierra (1957) (Tween 80 : 10 ml ; NaNO₃ : 1 g/l ; extrait de levure : 5 g/l ; solution saline: 50 ml ; CaCl₂, 2H₂O: 0,1 g/l ; agar : 18 g/l ; pH 7,2). Elle se manifeste par l'apparition d'une auréole opaque autour des colonies.

4. Dégradation de l'Adénine, Guanine et Tyrosine:

Le test de dégradation de l'Adénine, Guanine et Tyrosine a été réalisé selon la méthode décrite par Goodfellow, (1971) et Gordon *et al.* (1974). 0.4 g de chaque composés (sauf pour la Guanine : 0.2 g) est suspendu dans 10 ml d'eau distillée puis stérilisé. La suspension est ajoutée à 100 ml de gélose nutritive (5

g ; extrait de viande 1 g/l ; extrait de levure 2 g/l ; NaCl 5 g/l ; agar 15 g/l ; pH 7,5) stérile maintenue en surfusion à 50°C. La dégradation se manifeste par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies.

5. Dégradation de l'amidon :

La dégradation de l'amidon est vérifiée selon la méthode Marchal et Bourdon (1973). 10 g d'amidon sont mélangés avec 100 ml de gélose nutritive. Une solution de lugol permet de mettre en évidence la dégradation.

6. Dégradation de la gélatine :

La production de gélatinases par les bactéries a également été étudiée selon la méthode Marchal et Bourdon (1973). 4 g de gélatine sont ajoutés à 100 ml de gélose nutritive. Le réactif de frazier permet de mettre en évidence la dégradation par l'apparition d'une auréole claire autour des colonies.

7. Dégradation de la caséine :

10g de lait en poudre écrémé sont dissous dans 100ml d'eau distillée (pH 7.5), puis stérilisés par autoclavage. 10ml d'eau distillée contenant 3.6g d'agar sont parallèlement autoclavés. Ces deux solutions sont mélangées aseptiquement puis coulées en boîtes de Petri. L'apparition d'une auréole claire autour des colonies indique la dégradation de la caséine.

8. Production de lecithinases :

La production de lecithinases par les souches est testée sur milieu Egg-Yolk de Nitsch et Kutzner, (1969). L'activité est examinée après 2, 4 et 7 jours d'incubation et se manifeste par l'apparition d'une zone claire autour des colonies.

9. Dégradation de la chitine :

La dégradation de la chitine est observée sur milieu Chitine-agar préconisé par Hsu et Lockwood (1975). Un volume de chitine colloïdale suffisant pour donner 4 g de chitine est ajouté au milieu. Le milieu est ensemencé et incubé à 30°C pendant 10 jours. L'apparition d'une zone claire autour des colonies révèle une activité positive.

10. Croissance à différentes températures :

La croissance à différentes températures a été réalisée sur milieu solide ISP₂ ensemencé avec la souche test et incubé à 10, 20, 30, 37 et 45°C pendant 7 à 10 jours.

11. Activité hémolytique :

Elle est réalisée sur gélose au sang (900 ml) additionnée de 100 ml de sang défibriné stérile et incubée à 30°C pendant 7 à 10 jours.

12. Hydrolyse de l'hydrogène sulfuré :

La recherche de la production d'hydrogène sulfuré a été réalisée sur gélose arginine glucose (peptone 5g ; extrait de levure 3g ; tryptone 10g ; NaCl 20g ; glucose 1g ; L-arginine 5g ; citrate d'ammonium et de fer 0.5g ; thiosulfate de sodium 0.3g, agar 15g. pH : 7.2).

13. Croissance à différentes concentrations d'NaCl :

La croissance des souches en présence de concentrations croissantes en chlorure de sodium a été évaluée sur milieu ISP₂ additionné de 5, 7 et 10 g/l d'NaCl puis incubée à 30°C pendant 7 à 10 jours.

IV. Identification moléculaire :

L'identification moléculaire des souches repose sur le principe suivant : l'ADN total de chaque souche est extrait et des amorces complémentaires de la région codant le gène 16S sont ajoutées à la préparation après dénaturation de l'ADN. L'étape de dénaturation permet aux amorces de s'hybrider avec la séquence qui leur est complémentaire. Grâce à une enzyme appelée ADN polymérase, la région codante est amplifiée. Le morceau d'ADN amplifié (en grand nombre de copies) est ensuite utilisé pour le séquençage. La séquence nucléotidique obtenue est analysée et comparée aux banques de données génomiques disponibles sur internet (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.)

1. Extraction de l'ADN génomique :

La procédure d'extraction est comme suit : Une önse de culture de la souche prélevée sur milieu solide (ISP₂) est suspendue dans 0.5 ml de tampon Tris-EDTA (10 mM Tris, 1 mM EDTA, pH 8). 50µl d'une solution de lysozyme (100 mg/ml) est ajoutée au tampon.

Après incubation overnight à 37°C, 70 µl d'une solution SDS à 10% et 6µl de protéinase K (10 mg/ml) sont ajoutés au tampon suivi d'une incubation à 65°C pendant 10 min. 500 µl de chloroforme-alcool isoamyl (24 :1) sont ajoutés à la suspension, suivi d'une agitation au vortex pendant 10 secs, puis d'une centrifugation à 3000 g est réalisée pendant 10 min. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube et l'ADN est précipité avec 600 µl d'isopropanol à -20°C pendant 30 min. La solution est centrifugée à 15000 g pendant 10 min et le culot subi deux lavages successifs avec de l'éthanol, séché à température ambiante

puis re-suspendu dans 10 µl de tampon TE 1X et conservé à -20°C [Hopwood *et al.*, 1985]. La pureté de l'ADN extrait a été noté par électrophorèse sur gel d'agarose à 0.8%.

1.1. Préparation du gel d'agarose :

Cette étape est réalisée avant l'extraction des acides nucléiques. Tout le matériel doit être propre et traité avec la DEPC (pyrocarbonate de diéthyle). Pour le plateau I de l'appareil d'électrophorèse GNA-100 (Pharmacia biotech) il faut préparer 30 ml d'agarose 0.8% selon la méthode suivante :

240 mg d'agarose sont placées dans un Erlenmeyer de 100 ml auquel nous ajoutons 30 ml de TBE 1X. Le mélange est chauffé sur une plaque chauffante ou dans un four à micro-onde jusqu'à dissolution de l'agarose en agitant de temps en temps pour homogénéiser. Après refroidissement de la solution jusqu'à 60°C environ nous ajoutons 1.5 µl de Bromure d'Éthidium (10 mg/ml) pour une concentration finale de 0.5 µg/ml et le mélange est agité pour homogénéisation.

Remarque : Le gel peut être préparé sans EtBr et coloré après migration. Pour cela, immerger le gel dans du TBE contenant du EtBr (1µg/ml) pendant 15-30 min. Une décoloration n'est pas nécessaire mais peut être réalisée pour diminuer le fond fluorescent, en rinçant le gel dans l'eau pendant 10 min.

1.2. Préparation du dispositif d'électrophorèse :

La mise en place du processus d'électrophorèse s'est fait comme suit : l'extrémité du support de gel est fermée à l'aide de bandes adhésives, puis le peigne est placé en position sur le support. Le gel d'agarose est coulé lentement sur une épaisseur de 4 mm et refroidi jusqu'à solidification (30 min environ). Après solidification du gel, les bandes adhésives et le peigne sont retirés en évitant d'endommager les puits puis le support avec le gel sont placés en position dans la cuve d'électrophorèse.

1.3. Mise en place de l'électrophorèse :

Une migration sur gel d'agarose est nécessaire pour vérifier la présence, la pureté et la quantité d'acides nucléiques extraits.

Le gel est positionné dans la bonne direction, c.à.d. les puits sont situés du côté de la cathode (pôle noir) pour que les échantillons puissent migrer vers l'anode (pôle rouge). La cuve est ensuite remplie de TBE 1x de façon à recouvrir le gel d'environ 1 mm de tampon (\approx 300 ml). Les échantillons sont mélangés avec le tampon de charge dans des microtubes puis 5 µl de chaque échantillon sont déposés dans chaque puits. Le couvercle est mis en place et la migration a été effectuée à 65 V, 37 mA jusqu'à ce que le colorant de charge arrive à proximité du bord du gel. Un marqueur de poids moléculaire de 1 Kb (Invitrogen, Carlsbad, Calif.) a été utilisé et les gels ont été photographiés à l'aide du Photomat gel analysis and acquisition system (Microvision Instruments, Evry, France) .

Remarque : Pour une bonne séparation, la quantité d'ADN dans l'échantillon doit être comprise entre 0.05 et 0.5 µg sauf si les fragments d'ADN ont des tailles différentes, alors on peut séparer jusqu'à 5 µg d'ADN/puits.

2. Polymérase Chain Reaction (PCR) :

L'amplification du gène 16S est réalisée à l'aide du kit Accuprime Taq (Invitrogen, Carlsbad, Calif) et les amorces choisies sont les suivantes : 63f (CAGGCCTAACACATGCAACTC) et 1387r (GGGCGGGTGTACAAGGC). Le mélange PCR est composé de 5 µl de tampon PCR 10X (concentration finale : 1X), 0.6 µl d'amorce 16S-63f, 0.74 µl d'amorce 16S-1387r, 5 unités/µl de Taq Polymerase et 1µL d'ADN génomique pour un volume final de 50 µl [Hu *et al.*, 2000].

La PCR a été réalisée dans un thermocycleur (eppendorf mastercycler gradient) en utilisant un programme qui consistait en une dénaturation initiale à 94 ° C pendant 2 min, puis 30 cycles d'élongation (94°C pendant 45s, 55°C pendant 30s et 68°C pendant 30s). La dernière étape est effectuée à 68 ° C pendant 10 min. Deux blancs qui contiennent tous les composants du mélange réactionnel sauf l'échantillon d'ADN sont régulièrement utilisés comme témoins. Les produits de PCR ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et les images numériques ont été obtenues.

Remarque : les amorces sont fournies en solutions concentrées, il faut préparer des aliquotes diluées au 1/10 (1 µl amorce dans 9 µl eau ultrapure) pour chaque amorce. Ces dilutions seront utilisées dans les mélanges PCR.

2.1. Purification des produits PCR :

La purification des produits PCR a été réalisée à l'aide du kit *GenElute* selon le protocole suivant :

La colonne de purification *GenElute* est premièrement insérée dans son support (tube fourni), puis 0.5 ml de la solution de préparation « column preparation » est ajoutée à la colonne pour activation. Une centrifugation est effectuée et l'éluant est ensuite éliminé. 5 volume de la « binding solution » et 1 volume du mélange PCR sont mélangés puis transférées dans la colonne. Le mélange est Centrifugé à 16000 g pour 1 min, le surnageant est éliminé et la colonne est rincée à l'aide de 0.5 ml d'une solution de rinçage « wash solution » puis recentrifugé à 16000 g pour 1 minute. L'éluant est éliminé une seconde fois et la colonne est centrifugée à nouveau à 16000 g pour 2 min afin d'éliminer l'excès d'éthanol. La colonne est ensuite transférée dans un tube de 2 ml et 50 µl de la solution d'éluion « elution solution » ou de l'eau ultrapure sont ajoutée au centre de la colonne. Après une incubation à température ambiante pour 1 min, une dernière à même vitesse est réalisée pour éluer l'ADN. Ce dernier peut être immédiatement utilisé ou conservé à -20°C.

Remarque : veillez à bien mélanger les solutions du kit avant utilisation. Si un produit a précipité, chauffer à 55-65°C jusqu'à dissolution complète puis laisser refroidir. Ajouter 48 ml d'éthanol pur à la solution de rinçage (wash solution) et bien refermer le flacon après chaque utilisation pour éviter l'évaporation.

3. Séquençage :

Les produits PCR purifiés ont été séquencés par le laboratoire de biologie moléculaire Genoscreen (France) qui utilise le BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit et le 3730xl sequencer (Applied Biosystems, Fermont, Calif). Après la PCR et la purification, l'ADN est dilué pour obtenir une concentration de 25 ng/μL. Pour chaque produit PCR, deux réactions de séquences sont réalisées, chacune à partir d'une amorce. La réaction de séquence contient : 3,5 μL de tampon de séquençage 5X, 1 μL de *BigDye Terminator* 2,5X, 1 μL d'ADN, 3,2 pmol d'amorce, et de l'eau PPI pour un volume final de 20 μL. Les cycles de séquence comportent un cycle initial de dénaturation à 96°C pendant 1 min puis un enchaînement de 25 cycles de dénaturation (10 s), d'hybridation (5 s), et de polymérisation (4 min). Les ADN sont ensuite précipités dans un tampon éthanol (50μL), EDTA (2 μL à 125 mM) et acétate de sodium (2 μL à 3 M) pendant 15 min à température ambiante. Après une centrifugation (30 min, 3000 g, 4°C), le surnageant est éliminé. Cent microlitres d'éthanol à 70 % sont ajoutés. Après une centrifugation (15 min, 2000 g, 4°C) et l'élimination du surnageant, les ADN sont conservés à 4°C à l'abri de la lumière. Puis les échantillons sont traités par un séquenceur capillaire *ABI PRISM 3130xl*. Les chromatogrammes sont ensuite analysés à l'aide du logiciel *Bioedit Sequence Alignment Editor*.

Les séquences d'ADN 16S obtenues, ont été comparées aux séquences déposées dans la banque génomique de GenBank utilisant le programme BLAST (Version 2.0) disponible sur le site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Blast>.

Des alignements multiples entre les séquences des souches sélectionnées et celles apparentés (retirées de GenBank) ont été réalisés en utilisant le programme Clustal X 2.0.10. La phylogénie des souches a été effectuée grâce au programme MEGA 4.0.2 [Tamura *et al.*, 2007]. La méthode employée pour la phylogénie et celle du neighbor-joining [Saitou et Nei, 1987] utilisant l'algorithme du Maximum Likelihood [Felsenstein, 1981] et un re-échantillonnage nonparamétrique du Bootstrap, avec une valeur calculé à partir de 500 répétitions [Joseph *et al.*, 2009].

V. Activités antimicrobienne et cinétique de croissance et de production :

1. Test de l'activité :

L'activité biologique a été testée vis à vis de souches bactériennes et fongiques (moisissures et levures) de référence ATCC obtenues à l'Institut Pasteur de Lille (France).

Les tests ont été réalisés sur deux espèces bactériennes à Gram négatif : *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027, ainsi que quatre espèces à Gram positif : *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Micrococcus latus* ATCC 4698, *Streptococcus faecalis* ATCC 49332 et *Staphylococcus aureus* MRSA ATCC

43300, une moisissure : *Aspergillus niger* ATCC 16404 et deux levures : *Candida albicans* ATCC 10231, et *Rodotorula mucilaginosa* ATCC 9449.

1.1. Technique de la double couche :

Le test d'activité a été réalisé selon la technique de la double couche [Vidaver *et al.* 1972]. La souche d'actinomycète à tester est ensemencée au centre d'une gélose ISP₂ coulée en boîte de Petri. L'incubation se fait à 30°C pendant 8 jours. 1 ml de la suspension des microorganismes cibles est ensemencé en masse dans 100 ml de milieu gélosé en surfusion (environ 45°C). Les milieux utilisés sont : BCP pour *E.coli*, *Ps aeruginosa* et *B.subtilis* ; gélose Chapman pour *S.aureus* et gélose Sabouraud pour *A.niger*, *C.albicans*, et *R.mucilaginosa*.

Après agitation, chaque milieu est coulé en double couche sur la gélose ISP₂ renfermant la souche d'actinomycète. L'incubation se fait à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries. Les levures et moisissures sont incubées à 30 °C pendant 24 à 48 pour les levures et 5 à 10 jours pour les moisissures. Après le temps d'incubation les diamètres d'inhibition sont mesurés.

2. Cinétique de croissance et production en Erlenmeyer :

Les cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens ont été suivies en culture batch réalisés en erlen de 250 ml contenant 100 ml de milieu ISP₂ (soit 40% de leurs volumes totaux). Chaque erlen a été ensemencé avec 1ml d'une suspension de spores ajusté à 10⁷ CFU ml⁻¹. Les cultures ont été incubées à 30°C, sous agitation permanente de 250 rpm. Des prélèvements quotidiens à intervalle de 24h ont été effectués et ont servi d'une part à la détermination de la biomasse (en poids sec) et d'autre part à mesurer les diamètres des zones d'inhibitions vis-à-vis des microorganismes cibles.

2.1. Méthodes analytiques :

2.1.1. Estimation de la biomasse :

La concentration cellulaire a été exprimée en poids cellulaire sec après séchage à l'étuve à 105°C. Le volume de culture prélevé est transvasé dans un tube Falcon de 50 ml puis centrifugé à 5500 g pendant 15 min. Le filtrat de culture est récupéré dans un tube Flacon stérile et servira au test d'activité sur les microorganismes cibles. Le culot est re-suspendu dans un volume égal d'eau distillée stérile (lavage), puis re-centrifugé à 5500 g pendant 15 min. L'opération de lavage est répétée trois fois. Le surnageant est éliminé et le culot est transvaser dans une capsule en aluminium préalablement pesée (m_0). La capsule est ensuite mise au four à 105°C pour séchage, puis pesée jusqu'à poids constant (m).

Le poids sec est calculé selon l'équation suivante :

$$PS = (m - m_0)1000/V \quad (\text{g/l})$$

m = Poids de la capsule après séchage en g.

m_0 = poids de la capsule vide en g.

V = volume du liquide en ml.

2.1.2. Calcul des paramètres cinétique de croissance : [Scriban, 1999]

Vitesse de croissance instantanée:

$$r_x = [dX]/dt$$

r_x s'exprime en concentration de biomasse. temps⁻¹ (g.L⁻¹.h⁻¹), X : Biomasse en poids sec.

Vitesse de croissance spécifique :

$$\mu = r_x/[X] = d[X]/dt.1/[X]$$

μ s'exprime en temps⁻¹ (h⁻¹ ou min⁻¹)

2.1.3. Test d'activité sur les souches cibles :

A. Préparation du standard de turbidité McFarland :

Le standard de McFarland a été utilisé comme référence pour ajuster la turbidité des suspensions bactériennes pour le test de sensibilité.

La solution standard est préparée en ajoutant 0.5 ml de Barium dihydrate de chlorure (BaCl₂.2H₂O) 1% (p/v) à 99.5 ml d'acide sulfurique (H₂SO₄) 1%. La solution est conservée dans des tubes identiques à ceux qui seront utilisés pour préparer l'inoculum. Les tubes sont refermés hermétiquement avec de la cire ou de la paraffine pour éviter toute évaporation, puis réfrigérés ou conservés à température ambiante et à l'obscurité pendant 6 mois maximum. La solution est agitée avant chaque emploi.

B. Ensemencement et lecture :

L'activité antimicrobienne a été détectée sur la gélose de Mueller Hinton qui est le seul milieu de culture solide validé par les directives internationales et du NCCLS pour l'étude de sensibilité.

30 µl de filtrat de culture sont déposés à la surface de disques de papier buvard stérile de 8 mm de diamètres. Après absorption complète, les disques sont séchés puis déposés à la surface d'une gélose MH coulée en boîte et préalablement ensemencé avec le microorganisme cible. Les boîtes sont incubées pendant 2 heures à 4°C pour permettre la diffusion des molécules actives tout en inhibant momentanément la croissance de la souche test. Les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 18-24 heures pour les bactéries et 30°C pendant 2 à 5 jours pour les levures et moisissures. Les diamètres d'inhibitions sont alors mesurés.

3. Culture en biofermenteur :

Les cultures ont été effectuées dans un fermenteur Biostat B (B. Braun Biotech International) de 2 litres. Le fermenteur est inoculé avec 100 ml d'une préculture de 2 jours de la souche à étudier. Les paramètres de culture sont les suivants :

- La température est réglée à 30°C,
- Le pH initial du milieu est de 7,
- L'agitation initiale de 150 rpm,
- L'aération initiale est de 1vvm (volume d'air par volume de liquide par minute),
- Le pourcentage d'oxygène dissous est maintenu à au moins 30% de la saturation par modification de la vitesse d'agitation.

Remarque : Afin de limiter la formation de mousse, de l'acide pluronique est utilisée comme agent anti-mousse.

4. Effet de la source de carbone et d'azote :

Afin de tester l'influence de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la productivité des souches, 10 sources de carbone (glucose, amidon, arabinose, glycérol, saccharose, fructose, lactose, mannitol, sorbitol et xylose) ainsi que 10 sources d'azote (**Azotes inorganique** : NaNO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NH_4Cl et NH_4NO_3 ; **acides aminés** : alanine, méthionine, proline, asparagine, acide glutamique et arginine) ont été testés.

La méthode employée est celle du facteur à la fois qui constitue une étape primordiale dans la sélection des sources les plus importantes en vue d'une optimisation du milieu de culture pour un rendement maximal.

Le choix du milieu de culture s'est posé sur un milieu synthétique de base qui renferme les éléments minéraux indispensables à la croissance des microorganismes. Ce milieu a été décrit par Pandey *et al.* (2005).

Remarque : Les sources de carbone et d'azote utilisées sont stérilisées parallèlement au milieu de culture et sont additionnées au milieu juste avant inoculation. La stérilisation est réalisée par filtration sur filtre bactérien millipores de 0.2 μm .

A. Influence de la source de carbone :

Le milieu de base renfermant comme source d'azote de NaNO_3 à 0.5%, est additionné à chaque fois d'une source différente de carbone à la concentration finale de 1%.

B. Influence de la source d'azote :

Le milieu basal renfermant la meilleure source de carbone est additionné des différentes sources d'azote pour une concentration finale de 0.5%.

Les différentes cultures sont réalisées en Erlenmeyer de 250 ml contenant 50 ml de milieu de cultureensemencé avec 1 ml d'une suspension de spores de d'une densité optique de 0.05. Tous les milieux sont incubés à 30°C pendant 8 jours sous agitation permanente de 150 rpm.

VI. Extraction et caractérisation partielle des métabolites produits:

1. Culture en milieu liquide :

La production de métabolites actifs a été réalisée sur milieu ISP₂ liquide, les souches sont inoculées dans des Erlenmeyers de 500 ml contenant chacun 100 ml du milieu de culture. L'inoculum correspond à une pré-culture de 3 jours préparée dans des tubes contenant 5 ml du même milieu et les cultures sont incubées en aérobiose à 30°C sous agitation de 150 rpm/min.

2. Extraction par des solvants:

Après 10 jours d'incubation des souches à 30°C, le milieu de culture a été centrifugé à 9500 g et l'extraction des molécules bioactives est réalisée à partir du filtrat de culture. 10 ml de filtrat de culture est extrait avec un volume égal d'acétate d'éthyle. La phase organique est recueillie, déshydraté par passage à travers un filtre contenant du sulfate de sodium anhydre puis évaporée à sec. L'extrait est ensuite re-dissout dans 1ml de méthanol.

3. Techniques chromatographique:

3.1. Chromatographie sur couche mince (CCM) :

Une chromatographie sur couche mince à été réalisée pour une première séparation des métabolites. 5 µl de chaque extrait dissous dans du méthanol à été déposé sur des plaques de gel de silice Merck 60 F254 sur feuille d'aluminium. La migration à été réalisée dans une cuve de chromatographie dont la paroi à été tapissé d'un papier filtre et sous une l'atmosphère saturée durant 2 heures par la présence de 100 ml d'un mélange d'acétate d'éthyle-méthanol (92:8 v/v) utilisé comme solvant de migration.

Les plaques sont ensuite séchées sous hotte puis dans une étuve à 100°C pendant 15 minutes, puis examinées sous lampe UV à une longueur d'onde de λ_{max} = 365 nm. Le rapport frontal (Rf) de chaque métabolite est également calculé selon l'équation suivante :

$$\text{Rf} = \text{distance parcourue par la substance} / \text{distance parcourue par le front du solvant} = d/D$$

Remarque : Le Rf est caractéristique d'une substance donnée pour un éluant donnée sur un système support-phase stationnaire donné, il est le même que le constituant soit pur ou dans un mélange et ne dépend pas de la concentration du constituant dans le mélange.

4. Techniques spectrophotométriques :

4.1. Spectrophotométrie UV. Visible :

La spectrophotométrie d'absorption dans l'ultraviolet et le visible (UV-VIS) des molécules extraite à été réalisée à l'aide d'un spectrophotomètre Secomam doté d'une précision photométrique de $\pm 0,005$ Abs à 1 unité d'absorbance. Les spectres sont acquis dans des cuves de quartz et de trajet optique égal à 5 mm. L'analyse à été réalisée par un balayage de spectre entre 190 et 900nm (400-800 nm au visible). La ligne de base a été effectuée avec le solvant.

4.2. Spectrophotométrie infra-rouge :

La Spectroscopie Infrarouge des molécules à été effectué grâce à un spectrophotomètre de type Shimadzu FTIR- 8400S (Fourier Transformed Infra Red) doté d'une résolution de 0.85, 1, 2, 4, 8 et 16 cm^{-1} et d'un détecteur type DLATGS à haute sensibilité.

Après fractionnement sur CCM les différentes fractions des molécules produites ont été récupérés individuellement par grattage de la surface du gel de silice puis resuspendu dans 1 ml de méthanol. La silice est ensuite éliminé par filtration sur filtre seringue et le méthanol est évaporé pour l'obtention d'un extrait sec. Ce dernier est analysé par la technique du pastillage qui consiste mélanger quelques milligrammes de l'échantillon solide avec du bromure de potassium en poudre parfaitement sec et l'ensemble est ensuite placé dans un moule cylindrique entre deux pistons et soumis à une pression d'environ 7000 à 8000 bars. On obtient une pastille pratiquement transparente, d'environ 1,5 à 2 millimètres d'épaisseur, qui sera placée sur le faisceau du spectroscope. Le bromure de potassium étant transparent dans l'infrarouge classique (4000 à 600 cm^{-1}) on obtient uniquement les bandes d'absorption du composé [Jeffrey *et al.*, 1991]. Les bandes d'absorption sont données en nombres d'ondes ν (en cm^{-1})

Chapitre 1. Taxonomie et Physiologie

I. Introduction :

Les actinomycètes forment un vaste groupe de procaryotes appartenant à l'ordre des *Actinomycetales*. Ce groupe comprend actuellement plus de 40 genres et quelques centaines d'espèces [Holt *et al.*, 1994 ; Garrity *et al.*, 2004]. Le terme « actinomycètes » emprunté du grec, "Actys" (rayon) et "mykes" (champignon) explique que ces microorganismes ont d'abord été considérés comme des champignons en raison de leur capacité à former un véritable mycélium ramifié [Holt *et al.*, 1994]. Cependant, l'étude de leur organisation cellulaire a permis de les identifier aux bactéries.

Les actinomycètes sont des microorganismes Gram-positifs caractérisés par une teneur élevée en guanine-cytosine dans leur ADN (> 55%) [Goodfellow et Cross, 1984 ; Sanglier et Trujillo, 1997]. Ils sont chimio-organotrophes, hétérotrophes, aérobies strictes ou micro-aérophiles. En général, les conditions optimales pour leur croissance sont des températures comprises entre 25-30°C (50°C pour les Thermoactinomycètes) et un pH neutre, mais de nombreuses espèces ont été isolées à partir d'environnements extrêmes [Ensign *et al.*, 1993 ; Chun *et al.*, 1997 ; Watve *et al.*, 2001].

Ces micro-organismes sont ubiquitaires, on les rencontre dans tous les milieux naturels et ont été isolés à partir de différentes niches écologiques telles que : sols, air, fumier, composts, débris végétaux, pollen des plantes, sédiments marins, lacs, rivières, océans, glaciers, déserts, sols pollués...etc [Williams *et al.*, 1983 ; Jensen *et al.*, 1991 ; Zaitlin *et al.*, 2006].

Morphologiquement ce groupe inclut à la fois des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres au mycélium fugace ou encore des espèces au mycélium développé et persistant comme le Genre : *Streptomyces* [Fig.2] [Goodfellow et Williams, 1983]. Présentant un cycle de développement cellulaire asexué similaire à celui des champignons imparfaits [Locci et Sharples, 1984], les différents groupes d'actinomycètes peuvent sporuler soit en morcelant certaines hyphes pour former des conidies soit en produisant des endospores hautement résistantes à la chaleur [McCarthy et Williams, 1992]. Leur croissance s'effectue par formation de cloisons intercellulaires perpendiculairement à l'axe des hyphes ; mais chez certains genres, tel que : *Matophilus*, *Geodesnatophilus* et *Frankia*, les divisions cellulaires se produisent sur les plans les plus divers lors de la formation des spores. Ces derniers sont mobiles chez les Dermatophiles et *Geodesnatophilus*, mais immobiles chez les *Frankia*.

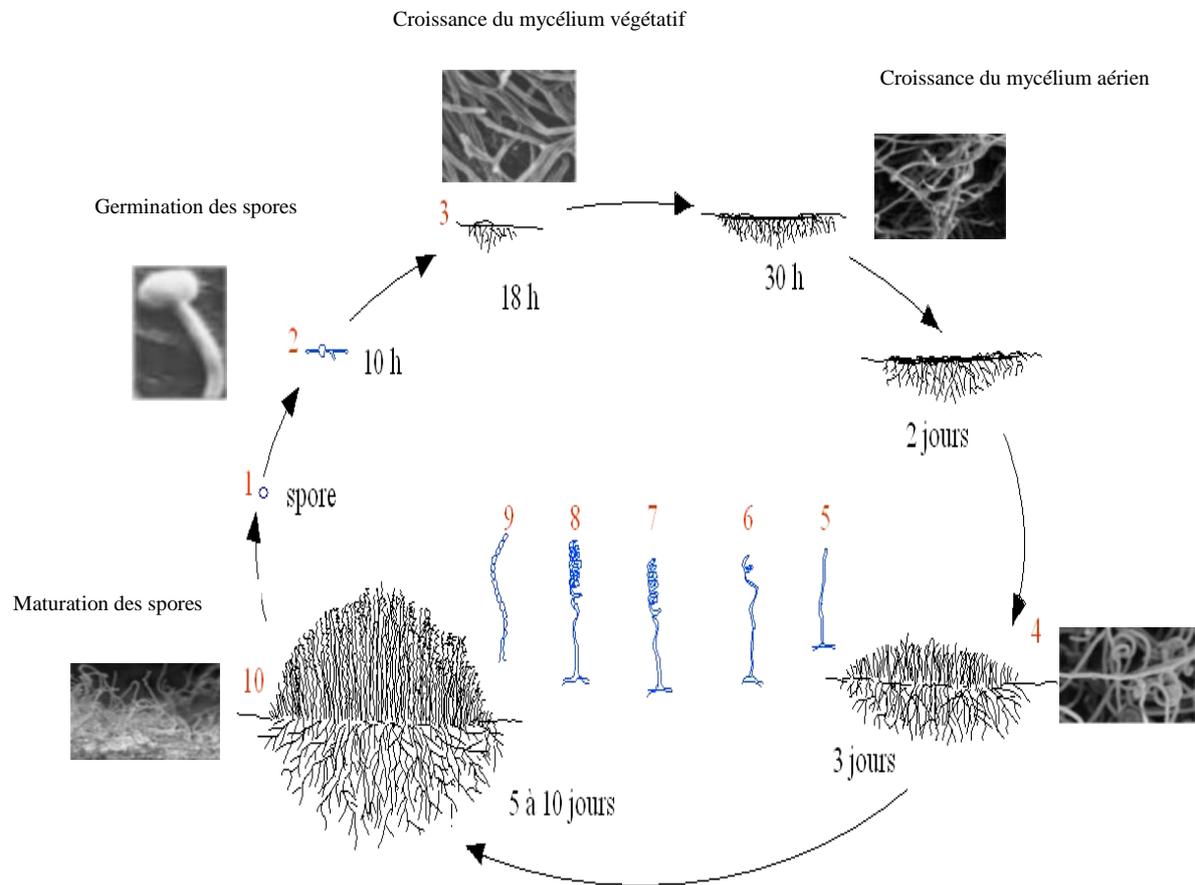


Figure 2. Cycle de développement du genre *Streptomyces* [Hopwood *et al.*, 1985]

Les actinomycètes jouent un rôle très important dans les phénomènes de biodégradation permettant le recyclage de la matière première et empêchant l'accumulation de déchets indésirables [Goodfellow *et Williams*, 1983].

De nombreux actinomycètes thermophiles et mésophiles comme *Thermonospora*, *Micromonospora*, *Streptomyces*, *Nocardia* etc.... peuvent décomposer des déchets agricoles ou urbains à haute teneur en produits chimiques. *Streptomyces flavogriseus*, produit des ligninases et des cellulases capables de bioconvertir les lignifères des graminées et du bois, tandis que d'autres actinomycètes sécrètent des xylanases, amylases, protéases et chitinases impliquées dans la biodégradation de la biomasse [Ball *et al.*, 1989 ; Pasti *et al.*, 1990 ; Mason *et al.*, 2001]. Ceci leur confère un rôle très important dans la fertilisation

des sols qui constituent leur habitat préférentiel et où ils sont généralement présents en nombre de 10^5 - 10^6 UFC par gramme de sol.

L'étude des caractéristiques physiologiques, biochimiques et morphologiques constituent une approche classique d'identification des Actinomycètes. Cette méthode décrite par Nonomura (1974) dans le Bergeys Manuel of Determinative Bacteriology s'est révélée très utile dans l'identification et la classification des souches notamment les Streptomycètes. Les caractéristiques les plus couramment employées dans cette taxonomie sont :

- La couleur du mycélium aérien (Blanc, gris, rouge, vert, bleu ou violet).
- La production de pigments mélanoïdes (Brun-verdâtre ou brun-noir).
- La couleur du mycélium du substrat.
- La production de pigments soluble (Rouge, orange, vert, jaune, bleu ou violet).
- L'assimilation des glucides (arabinose, xylose, inositol, mannitol, fructose, rhamnose, saccharose et raffinose).
- Morphologie des chaînes de spores (Rectiflexibles : RF, Retinaculiaperti : RA, ou Spirales : S). [Fig.3]
- Aspect de la surface des spores (Lisses : smooth ; épineuses : spiny; velues : hairy ou verruqueuses : Warty).
- Présence ou absence de structures particulières : Sporangies, sclérotas...etc.

L'introduction par Goodfellow (1971) de la taxonomie numérique a apporté de la clarté dans la reconnaissance, auparavant très confuse, des espèces. De manière schématique, la méthode consiste à étudier pour chaque souche plus d'une centaine de caractères morphologiques, biochimiques, culturels, présence ou absence d'un constituant cellulaire particulier (un acide gras membranaire, une protéine, une quinone...) et à attribuer le même poids à chacun des caractères qui sont codés 1 (présence du caractère) ou 0 (absence du caractère).

Le but recherché est de rassembler dans une classe de similitude (cluster) les individus les plus semblables. L'ensemble des caractères serviront à définir des pourcentages de similarité entre les organismes grâce à l'utilisation de coefficients de Jaccard, Sokal et Michener...etc [Williams *et al.*, 1983 ; Williams *et al.*, 1989]. Cette méthode s'est avérée utile notamment dans la différenciation des espèces appartenant au genre *Streptomyces* [Fig.4]. En effet, on estime à plus de 800 les espèces décrites par la taxonomie numérique [Goodfellow *et al.*, 1990].

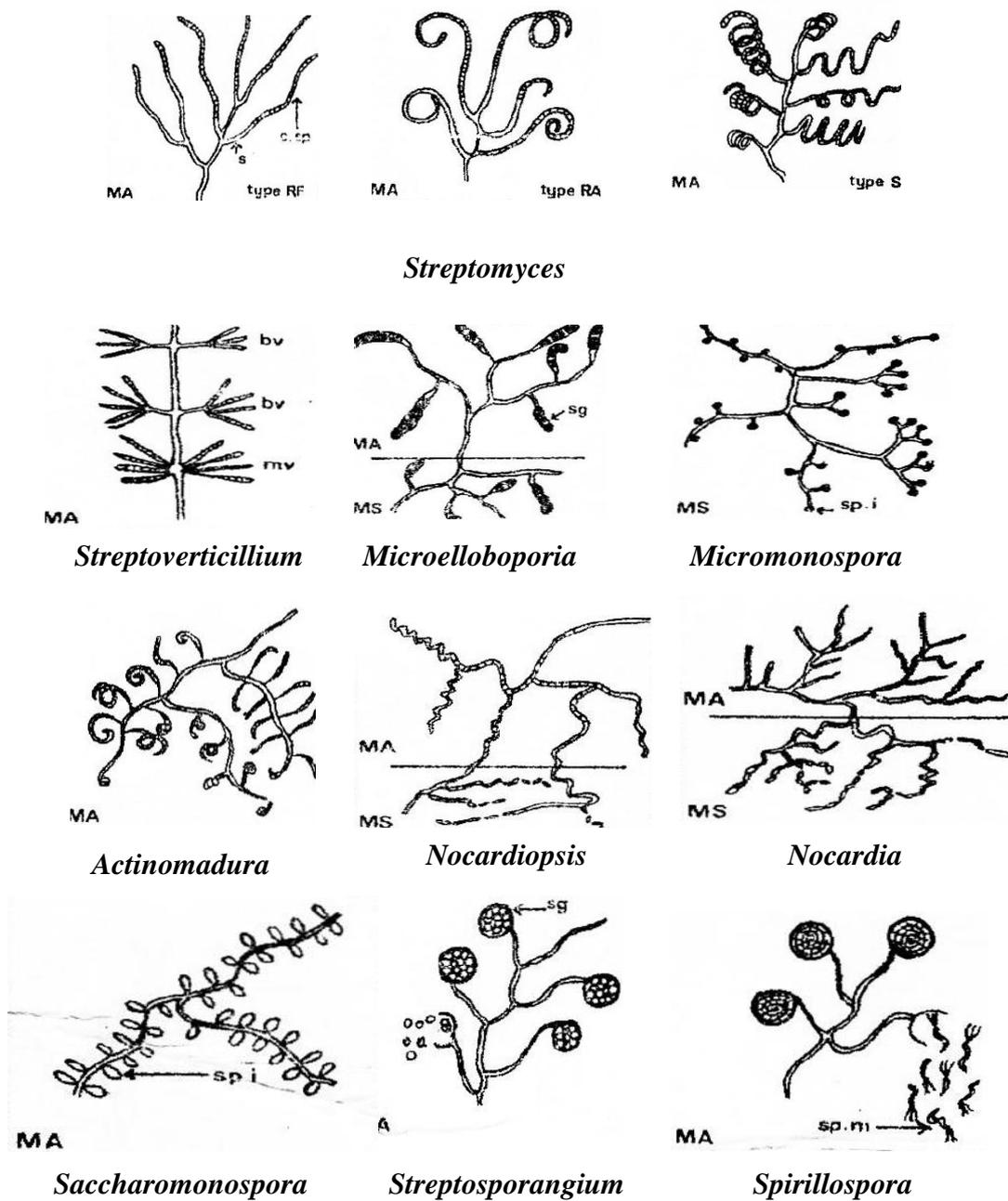


Figure 3. Micromorphologie des principaux genres d'actinomycètes : (RF) : Rectus flexibilis, (RA) : Retinaculum apertum, (S) : Spira, (MA) : Mycelium aérien, (MS) : Mycelium du substrat, (bv) : biverticillé, (mv) : monoverticillé, (s) : sporophore, (c.sp) : Chaîne de spore, (sp.i) : spores isolées, (sp.m) : spores mobiles, (sg) : sporange [Williams *et al.*, 1983].

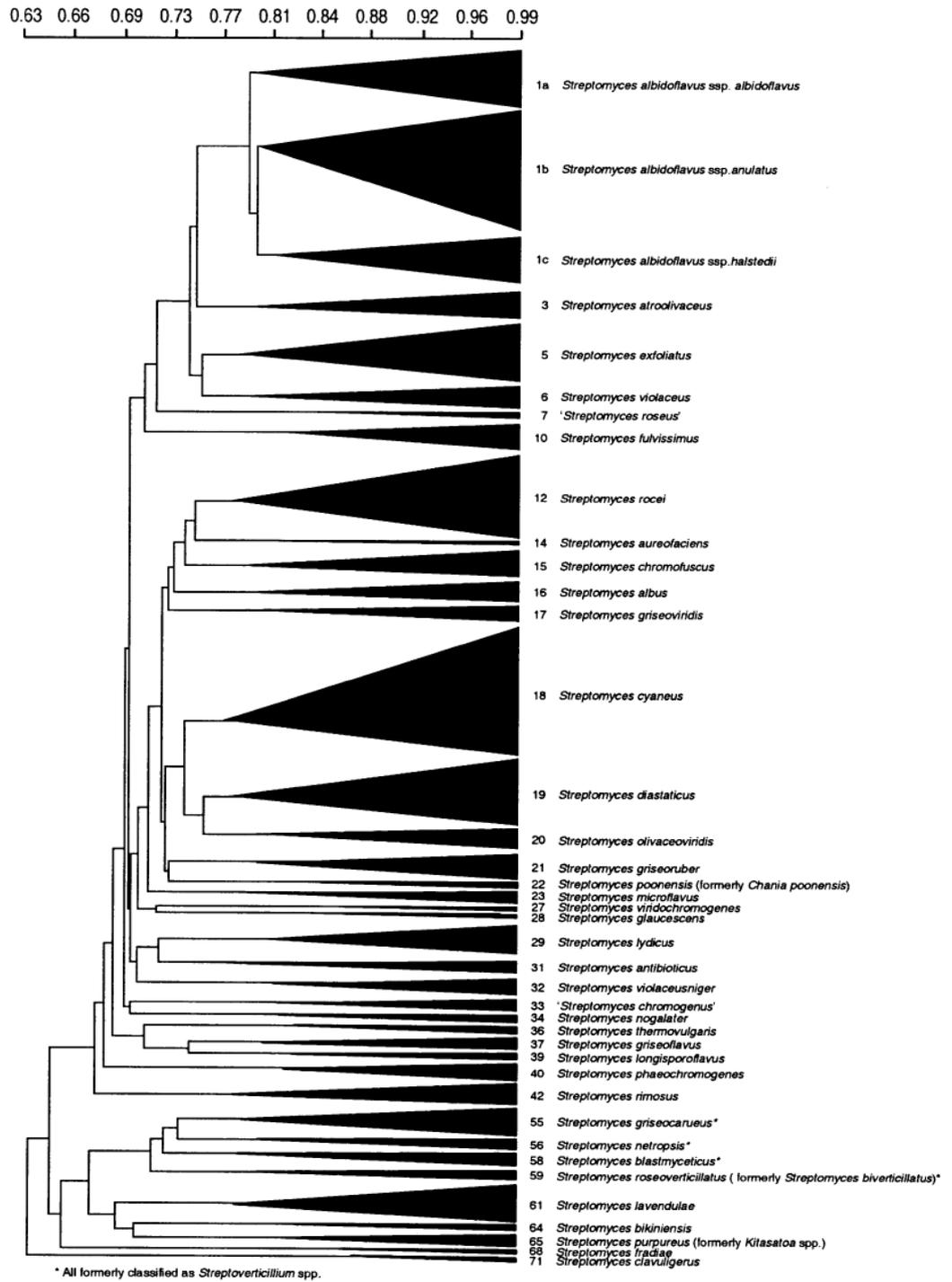


Figure 4. Dendrogramme simplifié relatant les cluster taxonomiques du genre *Streptomyces* utilisant la taxonomie numérique [Williams *et al.*, 1983].

Cependant, même en multipliant le nombre de caractères étudiés (jusqu'à 300 dans certaines études), la taxonomie numérique, qui constitue une méthode fastidieuse, n'évalue que 5 à 20 % du potentiel génétique d'une bactérie.

L'étude de composition chimique de la paroi des actinomycètes constitue un autre outil de différenciation. Cette méthode connue sous le nom de chimiotaxonomie, se base sur l'étude des variations chimiques des organismes et l'utilisation de critères chimiques (marqueurs) sélectionnés dans la classification et l'identification des organismes [Collins *et al.*, 1985].

Les critères chimiques utilisés dans la classification des actinomycètes sont surtout limités à certains composés des parois cellulaires [O'Donnel *et al.*, 1982] et ont permis de définir plusieurs types cellulaires rencontrés chez les actinomycètes [Tab.1].

Tableau 1. Types pariétaux en fonction des constituants distinctifs majeurs des parois cellulaires [Lechevalier et Lechevalier, 1980].

Type pariétal	Constituants distinctifs majeurs	Exemples de genres
I	LL-DAP, glycine	<i>Streptomyces</i>
II	méso-DAP, glycine	<i>Micromonospora,</i>
III	méso-DAP	<i>Actinomadura</i>
IV	méso DAP, arabinose, galactose	<i>Nocardia</i>
V	lysine, ornithine	<i>Actinomyces israelii</i>
VI	lysine	<i>Oerskovia</i>
VII	DAB, glycine	<i>Agromyces</i>
VIII	ornithine	<i>Cellulomonas</i>

DAP : acide 2,6 diaminopimélique ; DAB : acide 2,4 diaminobutyrique

Cependant, avec la prolifération des espèces, l'application des méthodes chimiques et morphologiques s'est avérée insuffisante pour la distinction d'organismes proches ou pour déterminer un groupement rationnel des genres actinomycétiques [Goodfellow *et al.*, 1988].

Ainsi, plusieurs études ont suggéré l'utilisation des techniques moléculaires pour la classification des actinomycètes, à savoir : la détermination du taux d'hybridation ADN-ADN ou ADN-ARN et le séquençage partiel ou total de l'ARN et/ou l'ADN ribosomiaux [Goodfellow et Cross, 1984 ; Kieser *et al.*, 2000].

La systématique moléculaire, qui comprend à la fois la classification et l'identification des espèces, prend son origine dans le début de l'hybridation des acides nucléiques, mais a atteint un nouveau statut après l'introduction de techniques de séquençage des acides nucléiques [O'Donnell et *al.*, 1993]. L'importance des études phylogénétiques basées sur des séquences d'ADNr 16S est en augmentation dans la systématique de bactéries et d'actinomycètes [Yokota, 1997]. Actuellement, le séquençage de l'ADNr 16S, qui présente des zones génétiquement conservées pour chacune des espèces, est la méthode la plus utilisée pour le groupement phylogénétique chez les actinomycètes mais elle constitue également une base de leur identification.

II. Résultats :

1. Obtention du matériel biologique et conservation des souches :

Notre objectif premier a été l'étude de la taxonomie et physiologie de souches d'actinomycètes végétant au niveau du lac Oubeira. Dans ce sens plusieurs prélèvements d'échantillons d'eau et de sédiment ont été réalisés dans la partie sud-est du lac qui constitue la partie la plus accessible. La multiplication des prélèvements n'a pour but que l'obtention d'une large gamme de matériel biologique.

La mise en culture des isolats a été réalisée sur milieux spécifiques aux actinomycètes additionné de nystatine (antifongique) et gentamycine (antibiotique) dans le but de limiter la prolifération fongique et bactérienne de contamination.

Après 2 à 3 jours d'incubation, des colonies jeunes sont apparues présentant un aspect typique des actinomycètes. Ces colonies de forme ronde, sèches, de couleur beige clair à brun correspondent à la formation du mycélium de substrat. Celui-ci est apparu dans les premiers stades de la croissance et s'est développé sur la gélose puis s'est enfoncé radicalement dans le milieu. Ce mycélium peut être aussi observé sur le dos de la colonie lorsque le milieu est transparent. Entre le 4^{ème} et le 21^{ème} jour d'incubation les colonies prennent un aspect poudreux de couleur blanche à grise dans un premier temps, c'est le mycélium aérien. Ce dernier continue de se développer adoptant progressivement des couleurs variés, ce changement correspond à la formation des spores sur les extrémités des hyphes aériens.

Les colonies présentant cet aspect typique ont été repiquées et purifiées sur milieu ISP₂ qui constitue le milieu de référence pour la culture des actinomycètes et permet une bonne sporulation [Shirling et Gottlieb, 1966]. La conservation plus longue des souches purifiées a été réalisée selon la méthode d'Hopwood *et al.* (1985).

Les tubes de conservation serviront pour l'ensemble des travaux, chaque tube étant à usage unique de repiquage. En effet, des repiquages répétés peuvent provoquer une instabilité des souches, ce qui se traduit par une variabilité importante de leurs critères d'origine. Les effets les plus fréquemment observés dans ces cas portent sur la couleur des colonies, sur la capacité de développement ou de reproduction sur les substrats ainsi que sur la production de métabolites secondaires [Grovel, 2002].

Il faut remarquer que nous avons limité le nombre d'isolats traités, en raison de l'importance des manipulations sur chaque isolat. La sélection s'est basée selon les critères suivants :

- Une croissance rapide (entre 7 à 14 jours).
- Une bonne sporulation.
- La production de pigments diffusible ou non.

- Une opacification observée sur certains milieux caractéristique d'activités de dégradation.

Dix isolats ont été retenus pour la suite des expériences [Tab.2], un code composé de chiffres et de lettres a été attribué pour chacun d'entre eux. La première lettre du code correspond à l'origine du prélèvement de la souche : S = sédiment (Sediment), W = eau (water).

Tableau 2. Codes, origine et aspect des isolats sélectionnés.

Code	Milieu de prélèvement	Aspect cultural
WLN-001	Glycérol-Asparagine.Agar	Colonie blanchâtre, contour régulier, revers incolore.
SLO-014	Caseine.Agar	Colonie gris-jaunâtre, contour régulier, revers gris foncé.
WLO-016	Gauss	Colonie grise, contour irrégulier, revers blanchâtre.
SLN-021	Gauss	Colonie gris-jaunâtre, contour régulier, revers verdâtre.
SLO-036	Caseine.Agar	Colonie beige-crème, contour régulier, revers jaunâtre.
SLN-041	Glycérol-Asparagine.Agar	Colonie blanchâtre, contour irrégulier, revers brun-jaunâtre.
WLN-051	Gauss	Colonie blanchâtre, contour régulier, revers jaunâtre.
WLO-059	Gauss	Colonie grise, contour régulier, halo rouge autour de la colonie, revers brun-rougeâtre.
WLO-084	Gauss	Colonie noirâtre, contour régulier, halo rouge autour de la colonie, revers rougeâtre.
SLO-105	Glycérol-Asparagine.Agar	Colonie blanc-jaunâtre, contour irrégulier, revers jaunâtre.

Les autres isolats ont été conservés pour servir de bactériothèque et feront l'objet d'études ultérieures.

2. Macro et micromorphologie des isolats :

2.1. Morphologie et caractéristiques culturelles :

L'aspect phénotypique et les caractères culturels ont été déterminés sur les milieux de culture ISP. L'importance de la croissance, le développement du mycélium aérien sur chaque milieu, la couleur du mycélium aérien et celui du substrat ainsi que la présence de pigments diffusibles ou non dans la gélose ont été observés et notés [Tab.3].

Tableau 3. Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats sélectionnés sur milieux ISP solides.

Caractéristiques des isolats		Milieu ISP ₁	Milieu ISP ₂	Milieu ISP ₃	Milieu ISP ₄	Milieu ISP ₅
Croissance	WLN-001	+	+++	+	+	+
	SLO-014	+++	+++	+++	++	+++
	WLO-016	+++	+++	+++	+++	+++
	SLN-021	++	++	+++	++	+
	SLO-036	+++	+++	++	+++	+++
	SLN-041	+	++	+++	++	+
	WLN-051	+	+++	+++	++	++
	WLO-059	+++	++	+++	++	++
	WLO-084	+++	+++	+++	++	++
	SLO-105	+	+++	++	++	++
Sporulation	WLN-001	-	+++	-	-	-
	SLO-014	+++	+++	+++	++	+++
	WLO-016	+++	+++	+++	++	+++
	SLN-021	-	++	+++	-	+
	SLO-036	+++	+	+++	++	+++
	SLN-041	+	++	+++	++	+++
	WLN-051	-	+++	+++	++	++
	WLO-059	++	+++	+++	++	++
	WLO-084	+++	+++	+++	++	+++
	SLO-105	-	+++	++	+	++

(+) : faible, (++) : moyenne, (+++) : bonne, (-) : absence.

Tableau 3. (Suite)

Caractéristiques des isolats		Milieu ISP1	Milieu ISP2	Milieu ISP3	Milieu ISP4	Milieu ISP5
Couleur du MA	WLN-001	v.Y	v.Y	v.Y	v.Y	v.Y
	SLO-014	d.Gy	d.Gy	d.Gy	gy.	d.gy.rBr
	WLO-016	l.gy.yBr	gy.G	d.gy.G	l.Gy	l.Gy
	SLN-021	y.White	y.White	y.White	y.White	l.gy.Br
	SLO-036	y.White	y.White	p.y	p.oY	p.y
	SLN-041	y.White	gy.yBr	y.Gy	y.Gr	gy.yBr
	WLN-051	v.oY	d.Gy	y.Gy	y.Gy	y.White
	WLO-059	y.White	d.Gy	l.gy.pR	l.gy.pR	y.White
	WLO-084	gy.R	g.Gy	gy.R	p.pK	y.White
	SLO-105	v.oY	v.oY	l.Gy	v.oY	l.oY
Couleur du MS	WLN-001	y.White	v.oY	y.White	y.White	y.White
	SLO-014	y.White	b.Y	y.Gy	y.White	y.Gy
	WLO-016	b.Y	gy.Y	b.y	y.White	y.White
	SLN-021	l.Y	b.Y	l.Y	y.White	b.Y
	SLO-036	b.Y	l.Y	y.White	b.Y	b.Y
	SLN-041	y.White	y.White	y.White	y.White	b.Y
	WLN-051	b.Y	b.Y	d.gy.Y	d.gy.Y	b.Y
	WLO-059	y.White	y.White	deep.rO	deep.rO	l.Y
	WLO-084	m.rO	deep.rO	m.rO	l.yPk	v.yPk
	SLO-105	deep.oY	deep.oY	deep.oY	deep.oY	l.oY
Pigmentation	WLN-001	v.Y	v.Y	v.Y	v.Y	v.Y
	SLO-014	-	deep.rBr	-	-	deep.rBr
	WLO-016	-	b.gY	b.gY	-	b.gY
	SLN-021	-	b.Y	b.y	-	-
	SLO-036	deep.rBr	-	deep.rBr	b.y	-
	SLN-041	-	deep.rBr	-	-	deep.rBr
	WLN-051	-	-	-	b.gY	-
	WLO-059	-	-	-	-	-
	WLO-084	-	deep.pR	-	-	-
	SLO-105	v.Y	v.Y	v.Y	v.Y	-

(v.Y) : jaune vif ; (d.Gy) : gris foncé ; (d.gy.rBr) : brun rougeâtre foncé grisâtre ; (l.gy.yBr) : brun jaunâtre clair grisâtre ; (gy.G) : vert grisâtre ; (gy.y.Br) : jaune brun grisâtre ; (d.gy.G) : vert foncé grisâtre ; (l.Gy) : gris clair ; (y.White) : blanc jaunâtre ; (l.gy.Br) : brun clair grisâtre ; (p.Y) : jaune pâle ; (p.oY) : jaune orangé pâle ; (g.Gy) : gris verdâtre ; (l.gy.pR) : rouge violacé claire grisâtre ; (gy.R) : gris rougeâtre ; (p.Pk) : rose pâle ; (v.oY) : jaune orangé vif ; (b.Y) : jaune brillant ; (gy.Y) : jaune grisâtre ; (l.Y) : jaune clair ; (d.gy.Y) : jaune foncé grisâtre ; (deep.rO) : orange rougeâtre profond ; (m.rO) : orange rougeâtre modéré ; (l.yPk) : rose jaunâtre clair ; (v.yPk) : rose jaunâtre vif ; (deep.oY) : jaune orangé profond ; (l.oY) : jaune orangé clair ; (deep.rBr) : brun rougeâtre profond ; (b.Y) : jaune brillant ; (b.gY) : jaune verdâtre brillant ; (deep.pR) : violet rougeâtre profond.

Sachant que la croissance et la sporulation des bactéries sont deux paramètres fortement liés et dépendent directement de la composition du milieu utilisé, on observe que les actinomycètes sélectionnés présentent dans l'ensemble une bonne croissance et sporulation sur tous les milieux ISP avec une préférence pour le milieu ISP₂ [Fig.5]. La croissance WLO-001 sur les milieux ISP₁, ISP₃, ISP₄ et ISP₅ est mauvaise et se traduit par une absence totale de sporulation sur ces milieux. Il en est de même pour : SLN-021 sur ISP₁ et ISP₄ ainsi que WLN-051 et SLO-105 sur milieu ISP₁.

Les mycéliums aériens présentent une variété de couleur dont prédominent les couleurs dans les séries : jaune et gris, tandis que les mycéliums du substrat sont colorés dans des tons généralement plus clairs (blanc jaunâtre) à l'exception de quelques isolats dont le mycélium de substrat est vivement coloré allant du jaune orangé à l'orange rougeâtre.

Toutes les isolats produisent un pigment (diffusible ou non) sur au moins l'un des milieux utilisés, exception faite pour WLO-059. Les isolats WLO-001 et SLO-105 produisent un pigment jaune vif diffusible dans la gélose. SLO-014, SLO-036 et SLN-041 produisent un pigment brun rougeâtre profond qui ne diffuse pas dans le milieu. Chez SLO-036, la couleur du pigment passe au jaune brillant sur le milieu ISP₄. WLO-016 et SLN-021 produisent respectivement des pigments de couleur jaune verdâtre brillant et jaune brillant. WLO-084 produit un pigment violet rougeâtre profond uniquement sur milieu ISP₂

2.2. Micromorphologie:

L'observation en microscopie optique (x10, x40 et x100) des isolats après une incubation de 14 jours à 30°C sur milieu ISP₂, révèle que tous développent un mycélium du substrat non fragmenté. Ce dernier, se présente sous forme de longs filaments Gram positif, ramifiés et dépourvus de septum (fragmentation).

La microscopie électronique à balayage a permis de mettre en évidence la présence de chaînes de spores qui prennent naissance par septation du mycélium aérien. Elles sont de formes droites (type RF) pour les souches WLO-016 et SLO-105 [Fig.6 ; C et J], en crochet (type RA) pour WLO-001, SLO-014 et SLO-036, WLO-059 et WLO-084 [Fig.6 ; A, B, E, H et I] en spirales (type S) pour SLN-021, SLN-041 et WLN-051 [Fig.6 ; D, F et G].

Le nombre de spores observé par chaîne et supérieur à 20, elles sont de formes arrondies à cylindriques, de surfaces lisses et non flagellés. Aucun sclérote ou sporange n'a été observé.

3. Physiologie des isolats :

La croissance des isolats en présence de différentes sources carbonées a démontrée leur capacité à utiliser la plupart des glucides testés [Tab.4]. Cependant, SLN-041, WLN-051, WLO-059 et WLO-084 présentent une mauvaise croissance et sporulation en présence de saccharose et une absence totale de croissance en présence de sorbitol. L'isolat WLO-084 est également incapable d'utiliser le fructose et le ribose comme source d'énergie pour sa croissance.

La production de pigments mélanoides observée sur milieux ISP₆ et ISP₇, révèlent que WLO-001, SLO-036, SLN-041 et SLO-105 produisent ces pigments sur les deux milieux tandis que SLN-021 produit ce pigment uniquement sur milieu ISP₇. Les autres isolats ne produisent pas de pigments mélanoides. La production d'hydrogène sulfuré est quant à elle observée uniquement chez SLO-014, SLN-041 et SLO-105.

L'étude des activités de dégradation des isolats montrent qu'ils produisent des enzymes capables de dégrader l'adénine et non la guanine, exception faite pour WLO-059 où l'activité de dégradation se traduit par la présence d'une zone réduite d'opacification autour de la colonie (faible activité). La dégradation de la tyrosine est quant à elle variable.

La plupart d'entre eux produisent des gélatinases et amidases ; aucun ne produit de chitinases. Des caséinases ne sont produites que par SLO-036 et WLN-059 et les lécithinases par WLO-001 et SLO-105. Aucun des isolats étudiés ne présente d'activité hémolytique.

Une température comprise entre 20 et 37°C semble favorable au développement des différentes souches. Seule SLO-036 présente une croissance à 45°C mais avec une absence totale de sporulation. Toutes préfèrent un pH légèrement acide à neutre compris entre 5 et 8 et tolèrent des concentrations en NaCl jusqu'à 5 g/l.

Tableau 4. Caractéristiques physiologiques des isolats.

Caractéristiques physiologiques	WLN-001	SLO-014	WLO-016	SLN-021	SLO-036	SLN-041	WLN-051	WLO-059	WLO-084	SLO-105
Utilisation des glucides										
Glucose (Témoin positif)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Saccharose	+	+	+	+	+	+	+/-	+	+/-	+
Arabinose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Lactose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Glycérol	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Sorbitol	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+
Mannitol	+/-	+	+	+	+	+	+	+	+/-	+
Ribose	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Production de pigments mélanoides										
Milieu ISP ₆	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+
Milieu ISP ₇	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
Production d'H₂S										
	-	+	-	-	-	-	+	-	-	+
Activité de dégradation										
Adénine	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Guanine	-	-	-	-	-	-	-	+/-	-	-
L-Tyrosine	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+
Tween 80	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+
Gélatine	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
Caséine	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Chitine	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Amidon	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-
Lécithine	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
Activité hémolytique										
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à différentes températures										
10°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20°C	+	+/-	+	+/-	+	+	+	+	+	+
37°C	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
45°C	-	-	-	-	+/-	-	-	-	-	-
Croissance à différents pH										
4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
8	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Croissance à différentes concentration en NaCl										
5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(+) : Positif ; (-) : négatif ; (+/-) : croissance mais absence de sporulation.

4. Identification moléculaire :

4.1. Extraction, amplification et BLAST:

Les protocoles employés pour l'extraction de l'ADN génomique des isolats ainsi que l'amplification du gène 16S ont permis l'obtention de séquences nucléotidique de 1300 paires de bases en moyenne [Fig.7].

Après le séquençage réalisé par le laboratoire Genoscreen (France), une étude comparative des séquences obtenues avec celles déposées dans la banque génomique Genbank utilisant le programme BLAST, a révélé que les 10 isolats sélectionnés sont apparentés au genre *Streptomyces* avec des pourcentages de similitude variables : 99-98% pour SLO-014, WLN-051, WLO-059, WLO-084 et SLO-105; 98% pour WLN-001 et WLO-016; 99-96% pour SLN-021; 99-97% pour SLO-036 et 98-97% pour SLN-041.

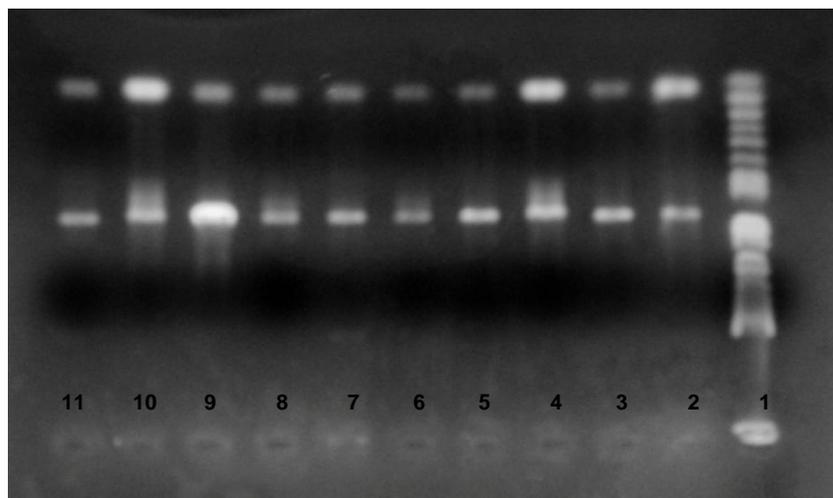


Figure 7. Amplification du gène 16S rDNA à partir des échantillons d'ADN extraits des isolats sélectionnés. **1** : Marqueur de poids moléculaire. Echelle 1 kb DNA ladder (Invitrogen) ; **2** : ADN souche WLN-001 ; **3** : ADN souche SLO-105 ; **4** : ADN souche SLO-014 ; **5** : ADN souche WLO-016 ; **6** : ADN souche SLN-021 ; **7** : ADN souche SLO-036 ; **8** : ADN souche SLN-041 ; **9** : ADN souche WLN-051 ; **10** : ADN souche WLO-059 et **11** : ADN souche WLO-084.

Les séquences des isolats sélectionnées ont été déposées dans Genbank et sont enregistrés sous les numéros d'accèsion suivant :

- | | |
|------------------------------------|---------------------|
| - WLN-001: GQ371156 | - SLO-014: GQ371157 |
| - WLO-016: HQ292262 | - SLN-021: GQ371158 |
| - SLO-036: GQ371159 | - SLN-041: HQ292263 |
| - WLN-051: GQ371160 | - WLO-059: HQ292264 |
| - WLO-084 : en cours de soumission | - SLO-105: GQ371155 |

4.2. Phylogénie:

L'alignement multiples dans le programme CLUSTAL X des séquences d'ADN 16S des isolats sélectionnés et ceux présentant un haut degré de similitude a permis de mettre en évidence leur phylogénie et la détermination des espèces apparentées. Une étude comparative des caractéristiques morphologiques et physiologiques des espèces appartenant à un même groupe phylogénique à été réalisé pour l'ensemble des souches.

A. *Streptomyces sp* WLO-001 :

L'arbre phylogéniques de *Streptomyces sp* WLN-001 [Fig.8], construit par la méthode du Neighbors joining, révèle la présence d'une seule branche la reliant à l'espèce *Streptomyces daejeonensis* KNF2047) avec une valeur Bootstrap de 63%.

Streptomyces daejeonensis a été isolée par Han et Kim (2007) et déposé à Genbank sous le numéro d'accèsion suivant : EU258679.1, mais malheureusement il n'existe à l'heure actuelle aucune publication apportant un descriptif de cette espèce permettant de conforter son apparenté avec WLN-001.

B. *Streptomyces sp* SLO-014 :

La phylogénie de SLO-014 [Fig.9], montre que cette dernière est apparentée à *Streptomyces cinnamocastaneus* NBRC 14278 (AB184588.1), *Streptomyces fragilis* NRRL 2424 (AY999917.1) et *Streptomyces fragilis* NBRC 12862 (AB184200.1). Aucune donnée concernant *Streptomyces cinnamocastaneus* et *Streptomyces fragilis* NBRC 12862 n'a pu être récolté pour une étude comparative. Ces deux espèces ont été isolées par Tamura *et al.* (2006).

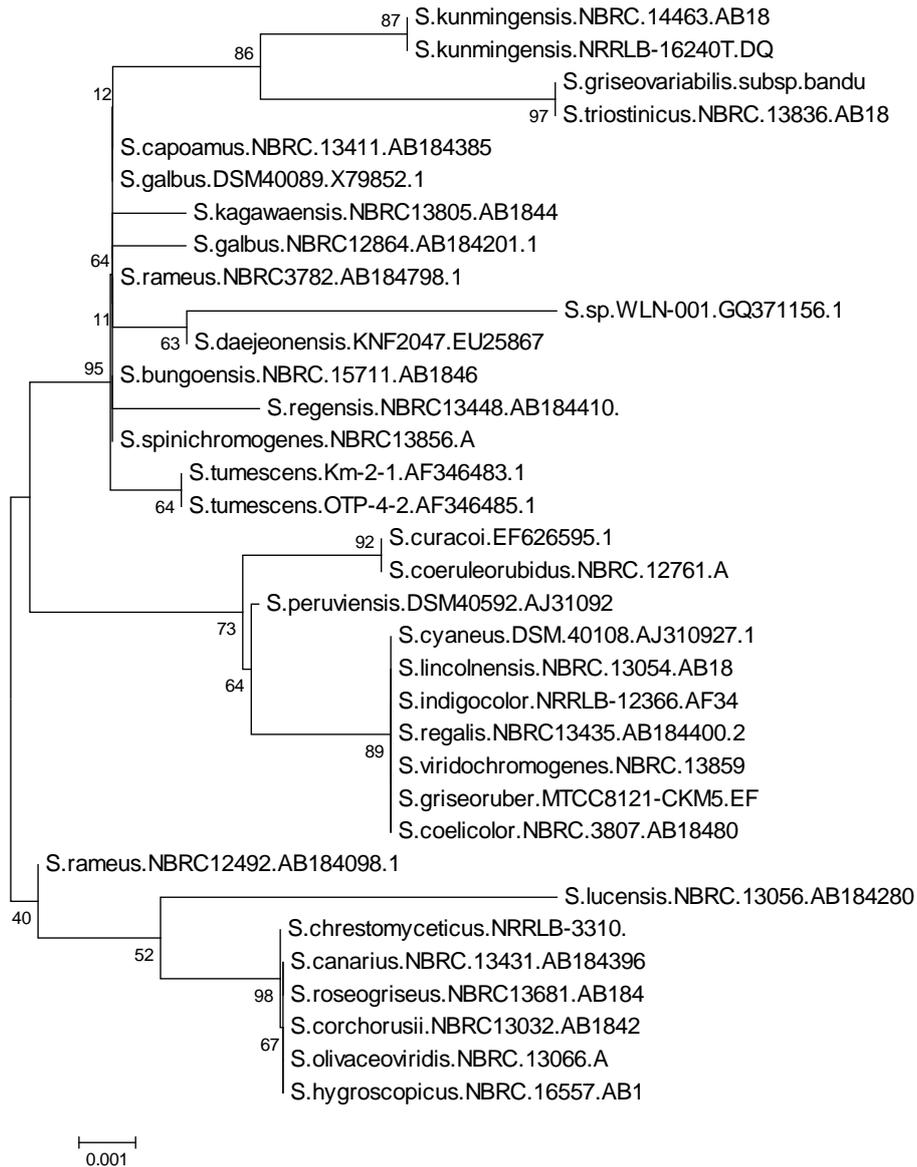


Figure 8. Arbre phylogénique de *Streptomyces* sp WLN-001 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.

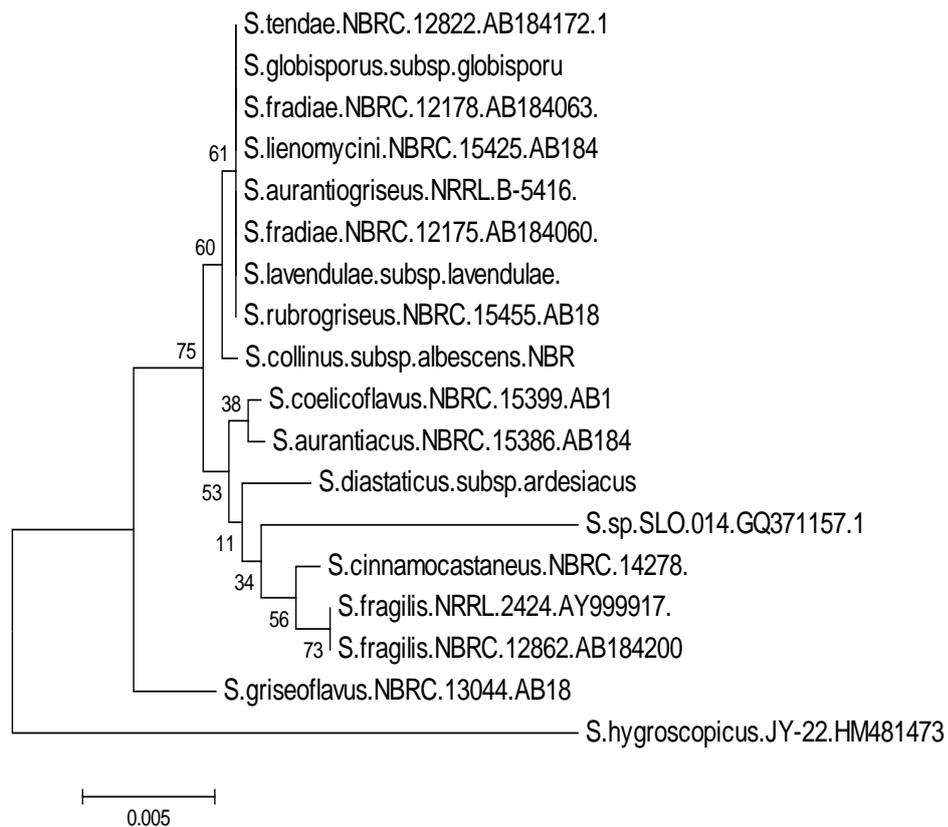


Figure 9. Arbre phylogénique de *Streptomyces sp* SLO-014 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l’algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L’échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.

La comparaison des caractéristiques morphologiques et physiologiques de SLO-014 et *Streptomyces fragilis* NRRL 2424 a permis de mettre en évidence des similitudes sur le plan macro et micromorphologique : un mycélium aérien dans la série des « gris », un mycélium de substrat de couleur jaune, des chaînes de spores de type « RA » et des spores de type « Sm ».

Toutefois sur le plan physiologique, les deux espèces présentent des différences notamment en ce qui concerne l’absence de pigmentation chez *S.fragilis* de même que l’utilisation des sources carbonées et la production d’H₂S [Tab.5].

Tableau 5. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp SLO-014* et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp SLO-014</i>	<i>Streptomyces fragilis</i> NRRL 2424 [Anderson et al. 1956]
Morphologie sur milieu ISP2		
Mycélium aérien	d.Gy	r.Gy
Mycélium du substrat	b.Y	y
Pigments soluble	deep.rBr	-
Micromorphologie		
Spore chaîne	RA	RA
Spore surface	Sm	Sm
Source de carbone		
Glucose	+	+
Xylose	+	-
Arabinose	+	+
Rhamnose	ND	-
Fructose	+	-
Mannitol	+	-
Saccharose	+	+
Productions de pigments mélanoides		
ISP6	-	-
ISP7	-	-
Production d'H₂S	+	-
Activité de dégradation		
Gélatine	+	+
Caséine	-	ND
Amidon	+	ND

(d.Gy) : gris foncé ; (b.Y) : jaune brillant ; (deep.rBr) : brun rougeâtre profond ; (r.Gy) : gris rougeâtre ; (Y) : jaune ; (RA) : Retinaculiaperti;

(Sm) : lisse ; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

C. *Streptomyces sp WLO-016* :

Streptomyces sp WLO-016 présente une apparenté phylogénique avec *Streptomyces argenteolus* NBRC 12841 (AB184187.1), *Streptomyces anulatus* NBRC 13369 (AB184875.1) et *Streptomyces flavovirens* NBRC 3412 (AB184832.1) [Fig.10].

Des similitudes entre les quatre espèces sont notées au niveau de leurs caractéristiques morphologiques : un mycélium du substrat de couleur Jaune, un mycélium aérien dans les tons « gris », des spores lisses regroupées en chaînes de type « RF », un pigment diffusible de couleur jaune : exception faite pour *S. argenteolus* et toutes sont capables d'utiliser la plupart des sucres testés. Les distinctions avec WLO-016 portent sur sa capacité à utiliser le saccharose comme source de carbone ainsi que l'absence de gélatinases chez cette dernière [Tab.6].

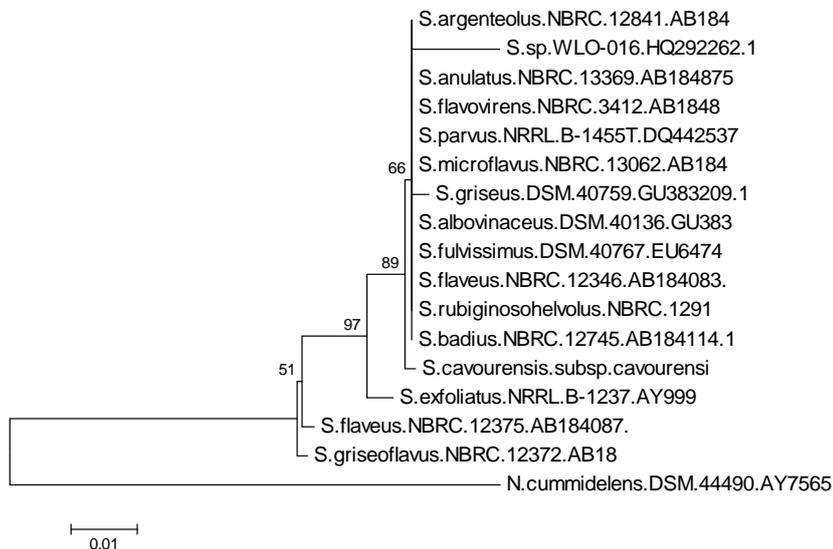


Figure 10. Arbre phylogénique de *Streptomyces* sp WLO-016 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l’algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L’échelle indique 0.01 substitutions par nucléotides position.

Tableau 6. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces* sp WLO-016 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces</i> sp WLO-016	<i>Streptomyces argenteolus</i> NBRC 12841 [Tresner <i>et al.</i> , 1961] [Liu <i>et al.</i> , 2005]	<i>Streptomyces anulatus</i> NBRC 13369 [Lindenbein, 1952] [Waksman, 1953] [Lanoot <i>et al.</i> , 2005]	<i>Streptomyces flavovirens</i> NBRC 3412 (Waksman <i>et</i> [Henrici, 1948])
Morphologie sur milieu ISP₂				
Mycélium aérien	gy.G	y.Gy	Y.White	Gy
Mycélium du substrat	gy.Y	y.Br	gy.y	Y
Pigments soluble	b.gY	-	v.Y	Y
Micromorphologie				
Spore chaîne	RF	RF	RF	RF
Spore surface	Sm	Sm	Sm	Sm
Source de carbone				
Glucose	+	+	+	+
Xylose	+	-	+	+
Arabinose	+	+	-	+
Rhamnose	ND	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	+	+
Saccharose	+	-	-	-
Production de pigments mélanoides				
ISP6	-	-	-	-
ISP7	-	+	-	-
Production d’H₂S				
	-	-	-	-
Activités de dégradation				
Gélatine	-	+	+	+
Caséine	-	ND	ND	ND
Amidon	+	ND	ND	ND

(gy.G) : vert grisâtre ; (gy.Y) : jaune grisâtre ; (b.gY) : jaune verdâtre brillant ; (y.Gy) : gris jaunâtre ; (y.White) : blanc jaunâtre ; (v.Y) : jaune vif ; (y.Br) : brun jaunâtre ; (Gy) : gris ; (Y) : jaune ; (RF) : rectiflexibles ; (Sm) : lisse ; (+) : positif ; (+)* : variable ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

D. *Streptomyces sp* SLN-021 :

L'espèce SLN-021 est apparentée à *Streptomyces aldersoniae* NRRL 18513 (EU170123.1) avec une branche unique [Fig.11]. Cette dernière anciennement connus sous la dénomination de *Streptomyces hygroscopicus* NRRL 18513, a récemment subit une reclassification par Kumar et Goodfellow (2010).

Les deux espèces présentent des spores lisses regroupées en chaînes de type « S », elles hydrolysent la caséine et l'amidon et utilisent la plupart des sucres testés [Tab.7]. La différence vient de l'aspect macroscopique : SLN-021 présente un mycélium aérien dans la série « blanc » tandis que *S.aldersoniae* un mycélium de type « gris », le mycélium du substrat est de couleur jaune chez SLN-021, il est dans les tons orange chez *S.aldersoniae*. Cette dernière ne produit pas de pigment mélanoïde ni de pigment diffusible à l'inverse de SLN-021.

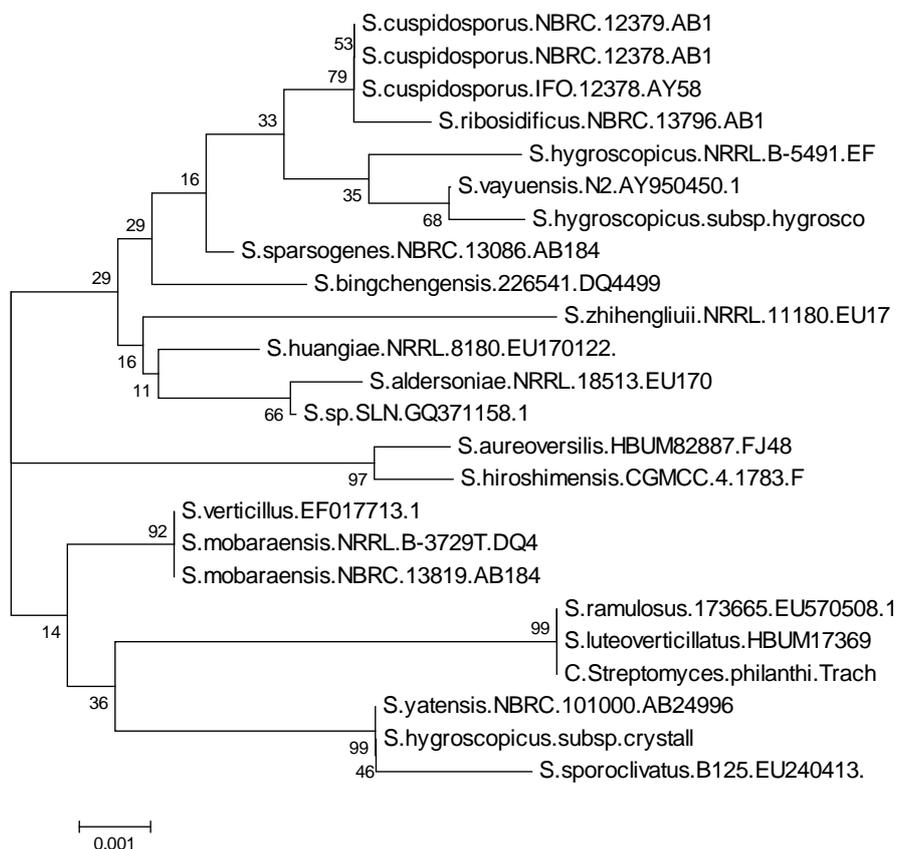


Figure 11. Arbre phylogénique de *Streptomyces sp* SLN-021 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.

Tableau 7. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp* SLN-021 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp</i> SLN-021	<i>Streptomyces aldersoniae</i> NRRL 18513 [Kumar et Goodfellow, 2010]
Morphologie sur milieu ISP2		
Mycélium aérien	y.White	w.Gy
Mycélium du substrat	b.Y	o.Y
Pigments soluble	b.Y	-
Micromorphologie		
Spore chaîne	S	S
Spore surface	Sm	Sm
Source de carbone		
Glucose	+	ND
Xylose	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	ND	+
Fructose	+	+
Mannitol	+	ND
Saccharose	+	ND
Production de pigments mélanoides+		
ISP6	-	-
ISP7	+	-
Production d'H₂S		
	-	ND
Activités de dégradation		
Gélatine	+	ND
Caséine	-	+
Amidon	+	+

(y.White) : jaune blanchâtre ; (b.Y) : jaune brillant, (w.Gy) : gris blanchâtre ; (o.Y) : jaune orange ; (S) : spirales ; (Sm) : lisse ; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

E. *Streptomyces sp* SLO-036 :

L'isolat SLO-036 est phylogénétiquement apparenté à *Streptomyces ghanaensis* NBRC 13032 (EU124570.1) et *Streptomyces roseorubens* NBRC 13682 (AB184462.2). Ces espèces forment un groupe phylogénique représenté par un indice bootstrap de 40% [Fig.12].

SLO-036 présente cependant de grandes différences macro et micro-morphologiques avec *Streptomyces ghanaensis* : le mycélium aérien est de type « blanc » pour SLO-036, il est dans la série « vert » chez *S.ghanaensis*. Les spores de SLO-036 sont lisses et sont regroupées dans des chaînes de type « RA », chez *S.ghanaensis* elles sont verruqueuses et regroupées en formes de spirales. Ces différences s'étendent également aux caractéristiques physiologiques notamment, l'utilisation du fructose et saccharose, la production de pigments mélanoides et gélatinases [Tab.8]. La comparaison avec *Streptomyces roseorubens* n'a pu être réalisée en raison de l'absence de données descriptive de l'espèce.

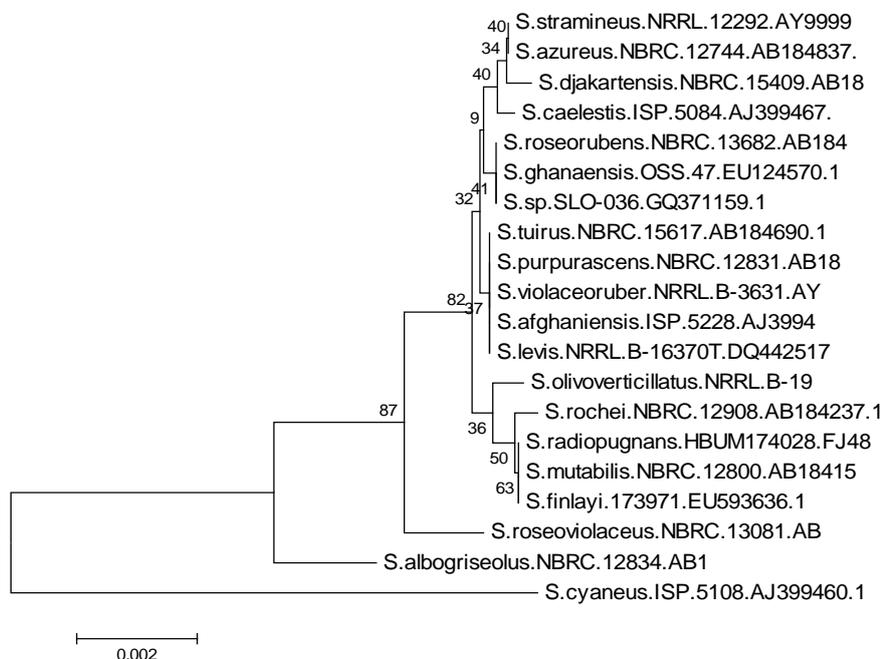


Figure 12. Arbre phylogénique de *Streptomyces sp* SLO-036 et espèces apparentées, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l’algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L’échelle indique 0.002 substitutions par nucléotides position.

Tableau 8. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp* SLO-036 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp</i> SLO-036	<i>Streptomyces ghanaensis</i> NBRC 13032 [Wallhäusser <i>et al.</i> 1966]
Morphologie sur milieu ISP2		
Mycélium aérien	y.White	G
Mycélium du substrat	l.Y	OIG
Pigments soluble	-	-
Micromorphologie		
Spore chaîne	RA	S
Spore surface	Sm	Wa
Source de carbone		
Glucose	+	+
Xylose	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	ND	+
Fructose	+	-
Mannitol	+	+
Saccharose	+	-
Production de pigments mélanoides		
ISP6	+	-
ISP7	+	-
Production d’H₂S		
	-	-
Activités de dégradation		
Gélatine	+	-
Caséine	+	ND
Amidon	+	ND

(y.White): jaune blanchâtre; (l.Y) : jaune clair ; (G) : vert ; (OLG) : vert olive ; (RA): retinaculiaperti ; (S):spirales; (Sm): lisse; (Wa): verruqueuses; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

F. *Streptomyces* sp SLN-041 :

L'arbre phylogénique de l'isolat SLN-041 le représente sous la forme d'une branche unique le distinguant des autres espèces présentant les degrés de similitude les plus élevés dans le BLAST. Les espèces les plus proches sont *Streptomyces argillaceus* (AB045885.1), *Streptomyces corchorussi* NBRC 13032 (AB184267.1), *Streptomyces roseogriseus* NBRC 13681 (AB184461.2) et *Streptomyces olivaceoviridis* NBRC 19066 (AB184288.1) regroupées par une branche avec un indice bootstrap de 48% [Fig.13]

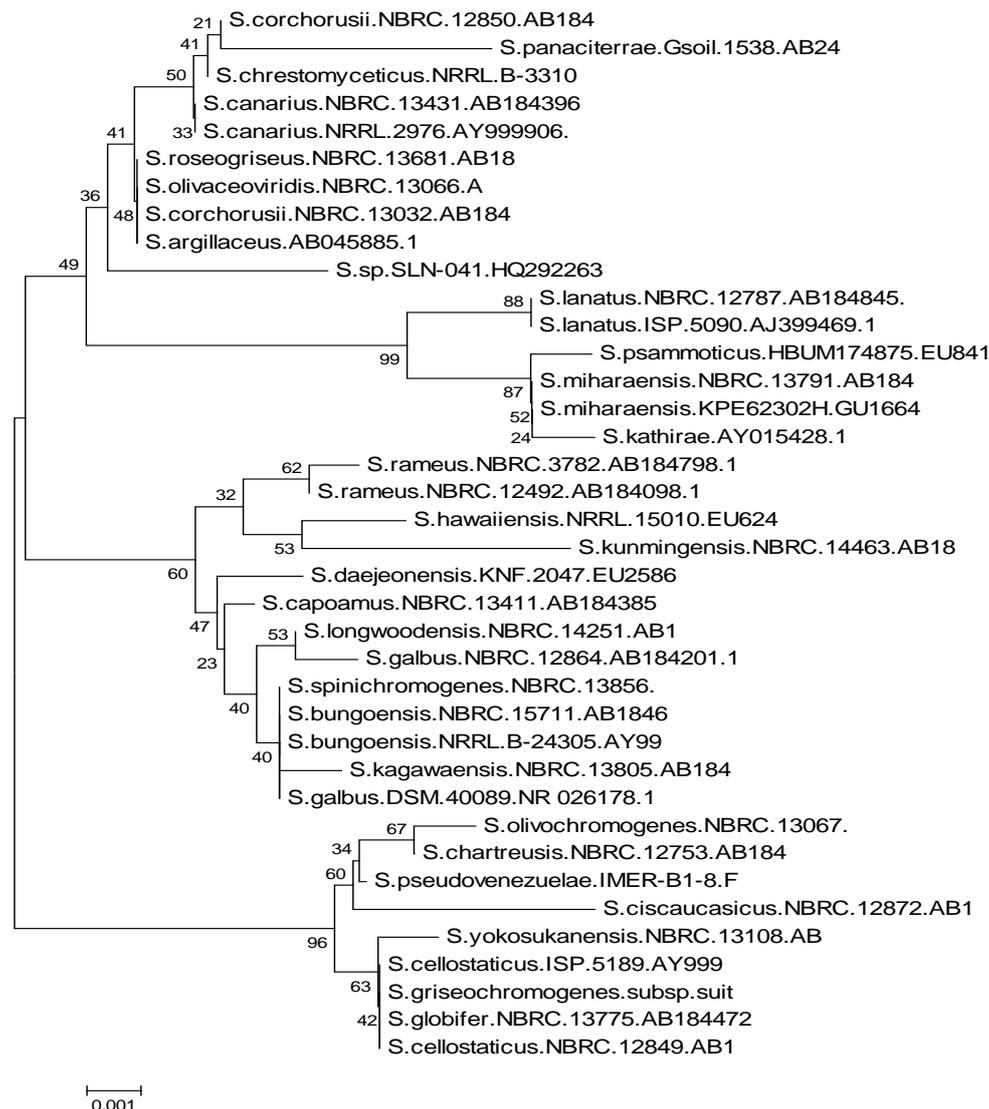


Figure 13. Arbre phylogénique de *Streptomyces* sp SLN-041 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.

Les caractéristiques morphologiques révèlent que toutes les espèces appartiennent à la série « gris », les spores sont de type « Sm » et les chaînes de spores de type « S » exception faite pour *S.olivaceoviridis* où elles sont de type « RF ».

Sur le plan physiologique on observe quelques différences notamment sur la production de pigment mélanoides, positive pour SLN-041 et *S.argillaceus* mais négative pour *S.corchorusii* et *S.olivaceoviridis* [Tab.9].

Streptomyces argillaceus présente les caractéristiques physiologiques les plus proches de SLN-041 mais elle s'en distingue essentiellement par la production de pigment diffusible de couleur brun- rougeâtre.

Tableau 9. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp* SLN-041 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp</i> SLN-041	<i>Streptomyces argillaceus</i> [Skarbek et Bray, 1978]	<i>Streptomyces corchorusii</i> NBRC 13032 [Ahmad and Bhuiyan.1958]	<i>Streptomyces olivaceoviridis</i> NBRC 19066 [Preobrazhenskaya et Ryabova 1957] [Pridham et al. 1958]
Morphologie sur milieu ISP2				
Mycélium aérien	gy.yBr	l.Ol.Gy	Gy	Ol.Gy
Mycélium du substrat	y.White	ND	l.Y	l.Ol.Gy
Pigments soluble	deep.rBr	-	-	-
Micromorphologie				
Spore chaîne	S	S	S	RF
Spore surface	Sm	Sm	Sm	Sm
Source de carbone				
Glucose	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	+
Arabinose	+	+	+	+
Rhamnose	ND	+	+	+
Fructose	+	+	+	+
Mannitol	+	+	-	+
Saccharose	+	-	-	-
Production de pigments mélanoides				
ISP6	+	+	-	-
ISP7	+	+	-	-
Production d'H₂S				
	-	-	-	-
Activités de dégradation				
Gélatine	+	ND	+	+
Caséine	-	ND	ND	ND
Amidon	-	ND	ND	ND

(gy.y.Br): jaune brun grisâtre ; (y.White) : jaune blanchâtre; (deep.r.Br) : brun rougeâtre profond ; (g.Gy.Br) : gris brun verdâtre ; (OlGy) : gris olive ; (l.Ol.Gy) : gris clair olivâtre; (Gy) : gris ; (l.Y) : jaune clair ; (S) : spirales ; (RF) : rectiflexibles ; (Sm) : lisse ; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

G. *Streptomyces sp* WLN-051 :

L'isolat WLN-051 est apparenté à *Streptomyces collinus subsp albescens* NBRC 12541 (AB184101.2), *Streptomyces diastaticus subsp ardesiacus* NBRC 15402 (AB184653.1) et *Streptomyces fradiae* NBRC 12215 (AB184069.1) également connus sous le nom de *Streptomyces fradiae* ATCC 10745 et *Streptomyces roseoflavus* [Fig.14].

Les trois premières espèces présentent de grandes similitude sur le plan macro et micromorphologique : un mycélium aérien de type « gris », un mycélium du substrat jaune, des spores de type « Sm » organisées en spirales. La présence de pigment diffusible n'est observée que chez *S.collinus sbsp albescens* [Tab.10]. Quelques différences physiologique sont cependant notées, elles concernent principalement la production de pigments mélanoïdes et l'hydrolyse de l'H₂S. *Streptomyces fradiae* présente en revanche des caractéristiques très différentes qui ne permettent pas de la rapprocher à WLN-051.

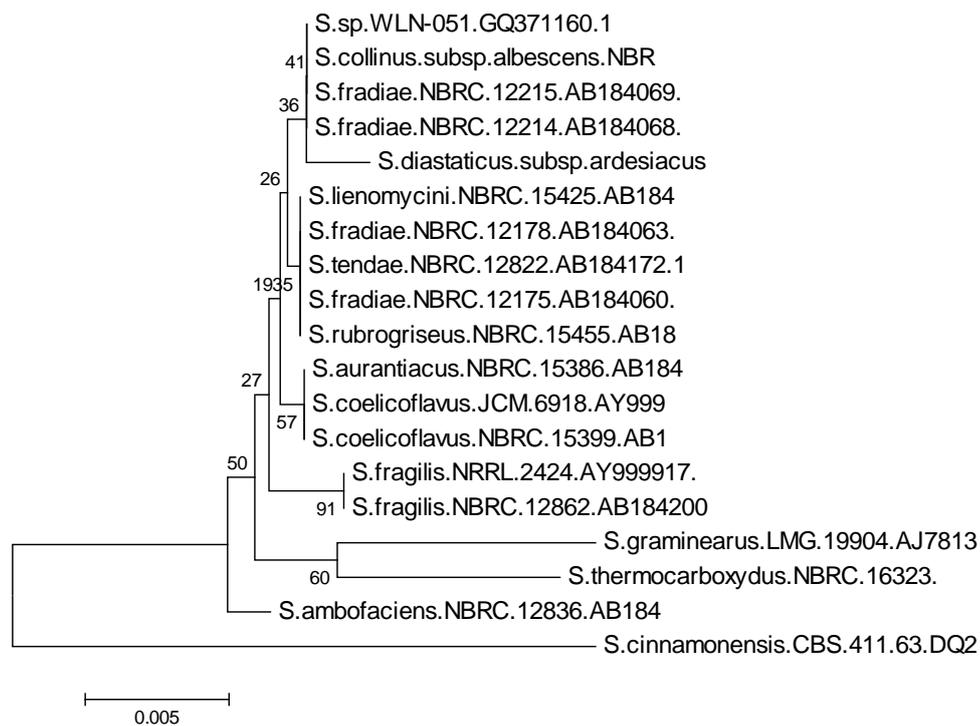


Figure 14. Arbre phylogénique de *Streptomyces sp* WLN-051 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.

Tableau 10. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp* WLN-051 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp</i> WLN-051	<i>Streptomyces</i> <i>collinus.subsp.albescens</i>	<i>Streptomyces</i> <i>diastaticus.subsp.ardesiacus</i> [Pridham et al. 1958]	<i>Streptomyces fradiae</i> NBRC 12215 [Waksman et Henrici, 1948] [Lanoot et al., 2004]
Morphologie sur milieu ISP2				
Mycélium aérien	d.Gy	b.Gy	Gy	Y
Mycélium du substrat	b.Y	v.oY	Y	y.Br
Pigments soluble	-	p.Y	-	-
Micromorphologie				
Spore chaîne	S	S	S	RA
Spore surface	Sm	Sm	Sm	Sm
Source de carbone				
Glucose	+	+	+	+
Xylose	+	+	+	-
Arabinose	+	+	+	-
Rhamnose	ND	+	-	-
Fructose	+	+	+	-
Mannitol	+/-	+	+	-
Saccharose	+	+	+	-
Production de pigments mélanoides				
ISP6	-	+	-	-
ISP7	-	+	-	-
Production d'H₂S	+	-	-	-
Activités de dégradation				
Gélatine	+	-	ND	+
Caséine	-	+	ND	ND
Amidon	+	+	ND	ND

(d.Gy) : gris foncé ; (b.Y) : jaune brillant ; (v.oY) : jaune orange vif ; (b.Gy) : gris brillant ; (p.Y) : jaune pale ; (Gy) : gris ; (Y) : jaune ; (y.Br) : brun jaunâtre ; (S) : spirales ; (RA) : retinaculiaperti ; (Sm) : lisse ; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé ; (+/-) : faible croissance.

H. *Streptomyces sp* WLO-059 :

WLO-059 est phylogénétiquement apparenté à *Streptomyces diastaticus subsp ardesiacus* NBRC 15402 (AB184653.1).

WLO-059 et *Streptomyces diastaticus subsp ardesiacus* présentent de grande similarité sur le plan macromorphologique et physiologique [Fig.15]. Les deux espèces exhibent un mycélium aérien dans la série « gris », un mycélium végétatif de couleur jaune, des spores lisses regroupées dans des chaînes de type « S ». Elles utilisent la plupart des sources de carbone testés, ne produisent pas de pigments solubles ni de pigment mélanoides [Tab.11].

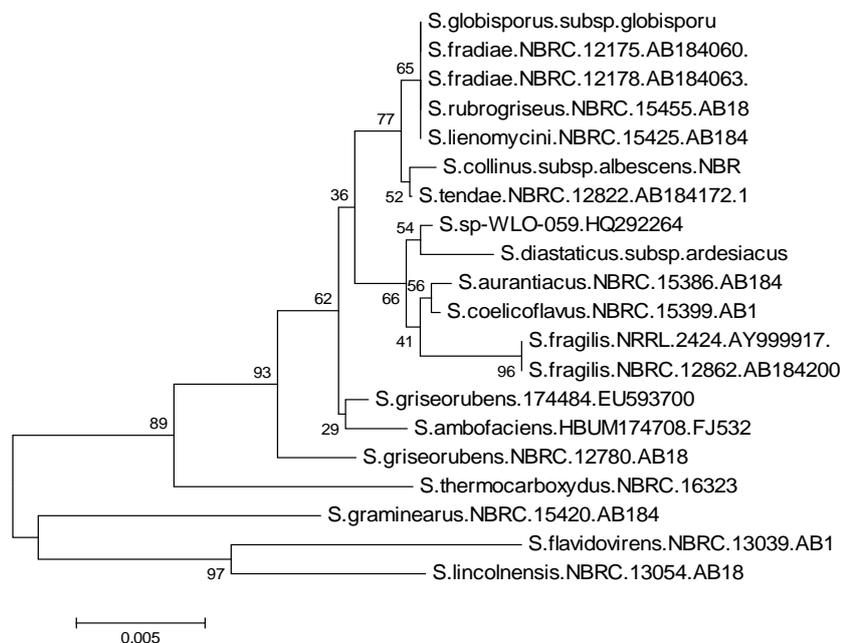


Figure 15. Arbre phylogénique de *Streptomyces* sp WLN-059 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l’algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L’échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.

Tableau 11. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces* sp WLO-059 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces</i> sp WLO-059	<i>Streptomyces diastaticus.subsp.ardesiacus</i> [Pridham et al. 1958]
Morphologie sur milieu ISP2		
Mycélium aérien	d.Gy	Gy
Mycélium du substrat	y.White	Y
Pigments soluble	-	-
Micromorphologie		
Spore chaîne	RA	S
Spore surface	Sm	Sm
Source de carbone		
Glucose	+	+
Xylose	+	+
Arabinose	+	+
Rhamnose	ND	-
Fructose	+	+
Mannitol	+	+
Saccharose	+	+
Production de pigment mélanoides		
ISP6	-	-
ISP7	-	-
Production d’H₂S		
	-	-
Activité de dégradation		
Gélatine	-	ND
Caséine	-	ND
Amidon	+	ND

(d.Gy) : gris foncé ; (y.White) : jaune blanchâtre ; (Gy) : gris ; (Y) : jaune ; (RA): retinaculiaperti ; (S):spirales; (Sm): lisse; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

I. *Streptomyces sp* WLO-084 :

L'arbre phylogénique de WLO-084 le relie par une branche unique à *Streptomyces fragilis* NRRL 2424 (AY999917.1) avec un indice bootstrap de 41% [Fig.16].

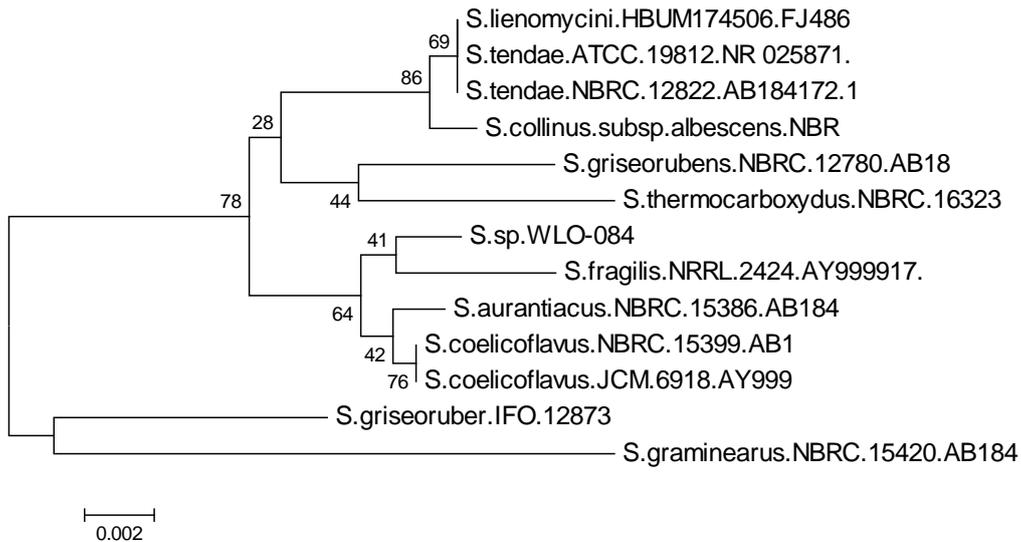


Figure 16. Arbre phylogénique de *Streptomyces sp* WLO-084 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Nei, 1987] en utilisant l'algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L'échelle indique 0.005 substitutions par nucléotides position.

Les deux espèces possèdent un mycélium aérien de même couleur : gris rougeâtres et des spores lisses agencées en chaînes de type « RA ». Toutes deux ne produisent pas de pigments mélanoides et n'hydrolysent pas l'H₂S mais dégradent la gélatine.

Les distinctions entre les deux espèces portent sur la couleur du mycélium du substrat, la production d'un pigment diffusible et l'utilisation du xylose et du mannitol par WLO-084 [Tab.12].

Tableau 12. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp* WLO-084 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp</i> WLO-084	<i>Streptomyces fragilis</i> NRRL 2424 [Anderson et al. 1956]
Morphologie sur milieu ISP2		
Mycélium aérien	r.Gy	r.Gy
Mycélium du substrat	deep.rO	y
Pigments soluble	deep.pR	-
Micromorphologie		
Chaîne de spores	RA	RA
Spore surface	Sm	Sm
Source de carbone		
Glucose	+	+
Xylose	+	-
Arabinose	+	+
Rhamnose	ND	-
Fructose	-	-
Mannitol	+/-	-
Saccharose	+/-	+
Production de pigments mélanoides		
ISP6	-	-
ISP7	-	-
Production d'H₂S		
	-	-
Activités de dégradation		
Gélatine	+	+
Caséine	-	ND
Amidon	-	ND

(r.Gy) : gris rougeâtre ; (deep.rO) : orange rougeâtre profond ; (deep.pR) : violet rougeâtre profond ; (Y) : jaune ; (RA) : Retinaculiaperti; (Sm) : lisse ; (+) : positif ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé ; (+/-) : faible croissance.

J. *Streptomyces sp* SLO-105 :

L'isolat SLO-105 est apparenté à *Streptomyces longwoodensis* NBRC 14251 (AB184580.1) et *Streptomyces galbus* NBRC 12864 (AB184207.1). Ces trois espèces forment dans l'arbre un groupe phylogénique distinct avec un indice bootstrap de 45% [Fig.17].

Streptomyces galbus semble la plus proche macro-morphologiquement de SLO-105 : mycélium dans la série « jaune », production de pigment diffusible de la même couleur. Cependant, la forme des spores et leur agencement sont très différents d'une espèce à l'autre : la chaîne de spore et de type « RF » pour SLO-105, « RA » pour *S.galbus* et « S » pour *S.longwoodensis*. Quelques distinctions sont également observées sur le plan physiologique [Tab.13].

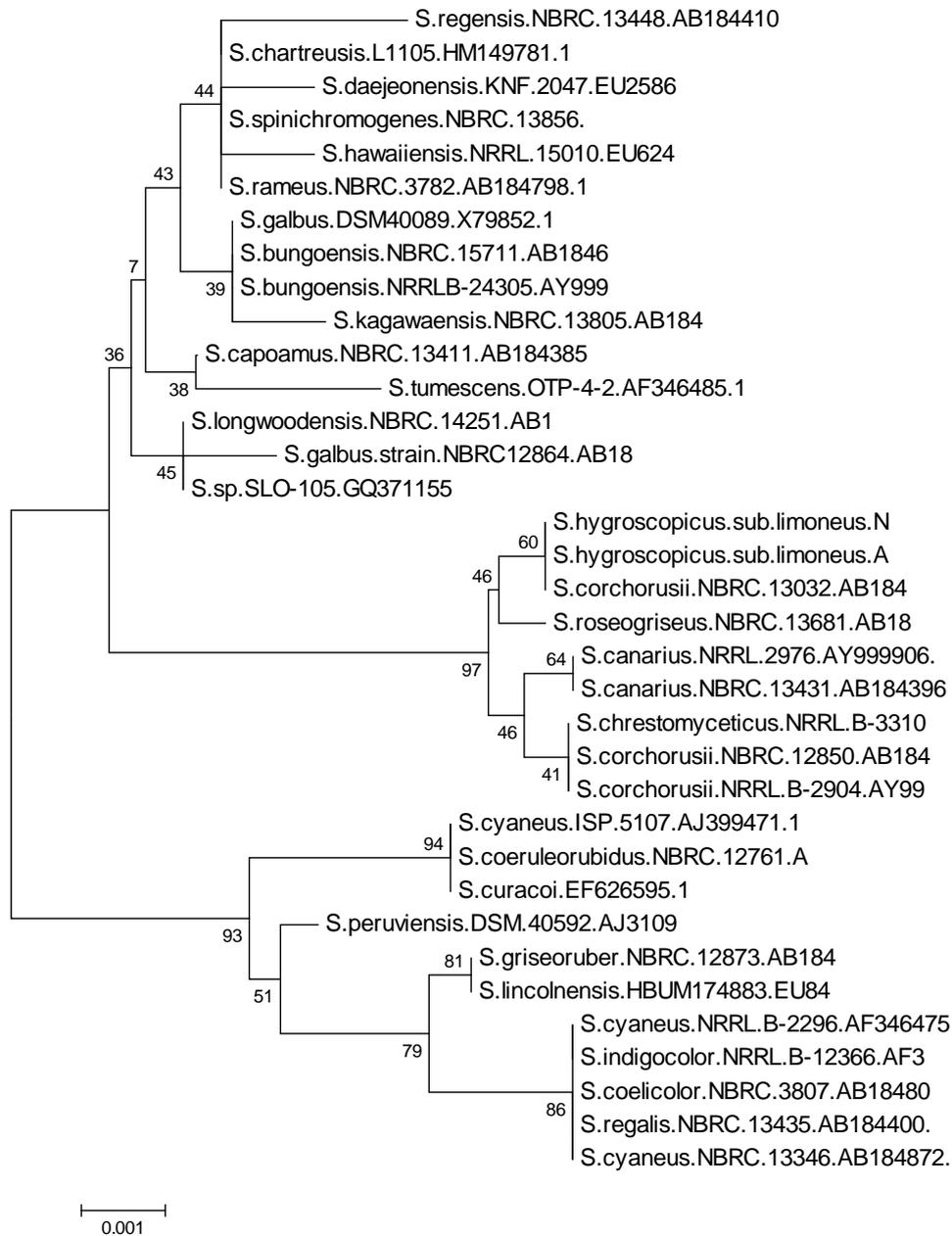


Figure 17. Arbre phylogénique de *Streptomyces* sp SLO-105 et espèces apparentés, élaboré par la méthode du Neighbour-joining [Saitou & Neil, 1987] en utilisant l’algorithme du Maximum-likelihood [Felsenstein, 1981]. Le chiffre à chaque branche indique la valeur Bootstrap basée sur 500 répétitions. L’échelle indique 0.001 substitutions par nucléotides position.

Tableau 13. Caractéristiques morphologiques et physiologiques de *Streptomyces sp* SLO-105 et espèces apparentées.

Caractéristiques	<i>Streptomyces sp</i> SLO-150	<i>Streptomyces galbus</i> NBRC 12864 [Frommer. 1959]	<i>Streptomyces longwoodensis</i> NBRC 14251 [Prosser et Palleroni .1981]
Morphologie sur milieu ISP2			
Mycélium aérien	v.oY	b.Y	Gy
Mycélium du substrat	deep.oY		Br
Pigments soluble	v.Y	Y	-
Micromorphologie			
Chaîne de spores	RF	RA	S
Spore surface	Sm	Wa	Sm
Source de carbone			
Glucose	+	+	+
Xylose	+	+	(+)*
Arabinose	+	+	(+)*
Rhamnose	ND	-	-
Fructose	+	+	+
Mannitol	+	+	(+)*
Saccharose	+	-	-
Production de pigments mélanoides			
ISP6	+	+	-
ISP7	+	-	+
Production d'H₂S	+	(+)*	+
Activités de dégradation			
Gélatine	+	-	+
Caséine	-	-	-
Amidon	-	+	-

(v.oY) : jaune orangé vif ; (deep.oY) : jaune orangé profond ; (v.Y) : jaune vif ; (b.y) : jaune brillant ; (Gy) : gris, (Br) : brun ; (Y) : jaune ; (RF) : rectiflexibles ; (RA) : retinaculiaperti ; (Sm) : lisse ; (S) : Spirales ; (+) : positif ; (+)* : variable ; (-) : négatif ; (ND) : non déterminé.

III. Discussion :

Les campagnes d'échantillonnage réalisées au niveau des eaux et sédiments du lac Oubeira (Parc National d'El-Kala) nous a permis dans un premier temps d'isoler une centaine d'isolats présentant des caractéristiques culturelles et morphologiques similaire à celle connues pour le groupe des Actinomycètes.

L'étude morphologique des 10 isolats retenus dans le cadre de ce présent travail a révélée que tous appartenaient au séries « gris » et « jaune » qui sont caractéristiques des Streptomycètes et genres apparentés, des Maduromycètes, des *Pseudonocardia* et genres apparentés ainsi que des *Nocardia*. Cependant, les éléments distinctifs reposent sur la formation par les isolats sélectionnées de chaînes de spores de type spirales (S), droites (RF) et flexibles (RA) constituées par des spores de types cylindrique et à la surface lisse. Ces caractéristiques sont typiques du genre *Streptomyces*. [Myadoh *et al.*, 2001 ; Ezra *et al.*, 2004].

Physiologiquement, tous les isolats se sont révélés métaboliquement actives. Cette activité métabolique s'est traduit d'une part par la production de pigment et d'autres part par un certains nombres d'activité de dégradations.

La production de pigment par les dix isolats étudiés a mis en évidence une réelle corrélation avec la composition du milieu de culture. Certains d'entre eux n'ont produit de pigment que sur un seul milieu, pour d'autres c'est la couleur du pigment qui varie considérablement d'un milieu à l'autre. De nombreuses études ont démontré que la présence ou l'absence d'un substrat donné conditionne la production ou non d'un pigment par les actinomycètes. En effet, Bruheim *et al.* (2002) ont mis en évidence la nécessité de la présence du glucose pour la production de l'actinorhodine par *Streptomyces lividans*.

Un certains nombres d'auteur tel que Thompson *et al.* (2002) et Alem *et al.* (2010) rapporte que les actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés. Ces derniers sont souvent des antibiotiques. Ces métabolites colorées peuvent être soit des Phénazines (pigment rouge brun) synthétisés par les genres *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Streptosporangium* et *Micromonospora* ; des Prodigiosines (pigment rouge) produits par les genres *Streptomyces* et *Actinomadura* ou bien des Caroténoïdes (pigment jaune ou orange) élaboré notamment par le genre *Streptomyces* [Kim *et al.*, 1997 ; Dharmaraj *et al.*, 2009], tel que la streptomycine de *Streptomyces griseus*, pigment de couleur jaune [Lee *et al.*, 2001]. Les souches isolées produisent essentiellement des pigments de couleur jaune à rouge qui peuvent être assimilés respectivement aux pigments caroténoïdes et phénazines.

La production de pigment mélanoïdes a également été notée chez les isolats étudiés. Cette caractéristique observée sur milieu ISP₆ et ISP₇ est considérée par Shirling et Gottlieb (1972) comme une clé pour la classification des espèces du genre *Streptomyces*. Cette production implique la présence de tyrosinase capable de dégrader la tyrosine en un composé initialement de couleur jaune : l'acide 5,6 dihydroxyindol qui forme de la mélanine (composé de couleur brun noir) par un processus de condensation [Margalith. 1992]. Cependant, de récentes études ont considérés que les pigments élaborées uniquement sur le milieu ISP₆ ne constituent pas des pigments mélanoïdes « proprement dit » mais des composés voisins. [Mizukami *et al.*, 2000]

Les isolats exhibent également de nombreuses activités enzymatiques telles que l'hydrolyse de l'hydrogène sulfuré, de la gélatine, de l'amidon ainsi que la lécithine. Ces substrats sont dégradés par certaines espèces de *Streptomyces* pour être utilisé comme source de carbone [Schatz *et al.*, 1956 ; Adelson *et al.*, 1957] mais également pour la production d'antibiotiques [Brock, 1956].

Se basant sur les directives du « Bergeys Manual of systematic bacteria » et « The International Streptomyces Project » [Shirling et Gottlieb, 1966], la combinaison entre les caractères morphologiques et physiologiques des souches, nous a conduits à les rapprocher au genre *Streptomyces*. L'étude moléculaire qui a consisté en l'extraction de l'ADN génomique, l'amplification et le séquençage de gène 16S suivi d'un BLAST à confirmer leur appartenance au genre *Streptomyces* avec des degrés de similitudes variable selon les espèces.

Les dix isolats sélectionnés se sont avérés appartenir au genre *Streptomyces*, cependant la prévalence des *Streptomyces* dans les environnements aquatiques et notamment les lacs, ainsi que leur caractère d'autochtone à long terme a été sujette à discussion. Les *Streptomyces* sont connus pour être les habitants naturels des sols au niveau desquels ils prédominent. On estime qu'ils constituent 1 à 20% de la biomasse tellurique [Schrempf, 2006].

Néanmoins, de nombreuses études tendent pourtant à confirmer leur présence dans des environnements aquatiques. Terkina *et al.* (2002) ont révélé la prédominance des genres *Streptomyces* et *Micromonospora* dans le lac Baikal (Russie) ; ils ont observé que les eaux du lac étaient dominées par *Streptomyces* (66 % des isolats) et les sédiments par *Micromonospora* (59 % des isolats). Les mêmes constatations ont également été rapportées par Rifaat (2003) au niveau de la rivière du Nil (Egypte).

Une étude réalisée par sur les sédiments du lac Loktak qui se situe dans une importante zone humide de Manipur (Inde), a montré que sur 172 isolats, la majorité appartenait au genre *Streptomyces* et des actinomycètes nocardioformes. Ces résultats sont différents de Terkina (2002) et Rifaat (2003), mais peuvent s'expliquer par le caractère trophique des lacs étudiés. En effet, le lac Baikal présente un caractère

oligotrophique alors que le lac Loktak est eutrophique et fortement pollué par des courants d'entrée des rivières voisines chargées de déchets et les eaux de ruissellement agricoles. Cette étude semble corroborer nos résultats sachant que le lac Oubeira présente également des caractéristiques eutrophique et se situe dans une région humide à forte activité agricole (activité anthropogéniques).

Le degré d'activité des *Streptomyces* dans les environnements aquatiques est également non clairement défini. Johnston et Cross (1976) isolent des souches de *streptomyces* sous forme de spores et suggèrent alors leur présence dans cet environnement sous forme de dormance résultant d'un processus de lessivage des sols. Pourtant quelques années plus tôt, Willoughby (1974) révèle que de nombreux phages isolés à la surface du lac Mud (Royaume Uni) ont non seulement montré une spécificité au *Streptomyces* mais il est également apparu qu'ils étaient différents des phages isolés de sol. Ceci indique que certaines espèces de *Streptomyces* sont actives dans les milieux lacustres d'eau douce.

Durant les dernières années les Streptomycètes ont été activement recherchés et isolés d'un certains nombres de milieux aquatiques [Sujatha *et al.*, 2005 ; Bredholt *et al.*, 2008]. Il apparaît donc que les *Streptomyces* aquatiques grâce à leur capacité à dégrader un certains nombre de macromolécules tel que protéines, polysaccharides, lipides...etc, jouent également un rôle important dans le turnover des matières organiques et même toxiques dans les environnements aquatiques [Schrempf, 2006].

Afin d'étudier la position taxonomique des espèces d'actinomycètes isolées, nous avons procédé à une analyse phylogénique basée sur le séquençage du gène 16S. Ce dernier constitue le marqueur moléculaire le plus utilisé dans ce type d'étude notamment en raison de sa stabilité. En effet, Les *Streptomyces* sont connues pour être génétiquement très instables avec des taux de mutation particulièrement élevés pour certains caractéristiques et qui persistent d'ailleurs en absence de pression sélectives apparentes [Chen *et al.*, 2002]. Ces mutations sont dues principalement à des délétions chromosomiques accompagnées d'amplification d'ADN [Leblond *et al.*, 1994].

L'utilisation de la méthode du Neighbour-joining mise au point par Saitou et Nei (1987) a permis de tracer la phylogénie des isolats et leur rapprochement aux espèces les plus voisines sur le plan génomique. Cette méthode fonctionne également par *clustering* est constituée l'une des techniques les plus utilisées à l'heure actuelle, notamment pour obtenir un premier arbre, de bonne qualité, qui pourra par la suite être amélioré par d'autres procédés tel que le Bootstrap qui permet de valider la fiabilité de chaque branche de l'arbre phylogénique.

L'extrapolation des données morphologiques et physiologiques des espèces apparentées a révélée quelques différences, entre les isolats récoltés au niveau des eaux et sédiments du lac Oubeira et les souches de références. Ces différences peuvent traduire une variabilité due à un processus d'adaptation aux conditions de l'environnement aquatiques de même que la possibilité d'échanges de matériels génétique entre espèces. Elles peuvent également refléter des mutations induites (pressions environnementale) ou

spontanées, sachant que les Streptomycètes présentent une grande versatilité chromosomiques et sont sujet a une forte instabilité génétique [Chen *et al.*, 2002].

En effet, des études réalisées sur *S. ambofaciens*, ont révélées l'apparition de variants phénotypiques affectés dans la pigmentation à une fréquence 1% dans la descendance de la souche sauvage [Martin *et al.*, 1998]. Cette caractéristique est partagée par toutes les espèces de *Streptomyces* chez lesquelles le phénomène a été étudié. L'instabilité génétique se caractérise par la perte de marqueurs génétiques. Dans la descendance de certains mutants, l'instabilité génétique atteint un niveau extrêmement élevé (87%) ; ce phénomène a été appelé "hypervariabilité" [Leblond *et al.*, 1994].

La possibilité de l'isolement de nouvelles espèces ou souches n'est pas non plus écarté et des études d'hybridation ADN-ADN entre les isolats du lac Oubeira et ceux phylogénétiquement proche sont nécessaire pour confirmer ou infirmer ces apparentés.

Cette étude constitue une première étude de la communauté actinomycétique du Lac Oubeira, d'autres analyses devront suivre pour authentifier l'originalité des isolats de même que la possibilité de leur caractère d'autochtone.

Chapitre 2. Activités microbiennes et cinétiques de croissance et de production.

I. Introduction :

Il a été estimé que sur un million de produits naturels rapportés, plus de 50.000 sont d'origine microbienne [Berdy, 2005] [Tab.14]. Environ la moitié d'entre eux ont été associés avec un certain niveau d'activité cellulaire ou moléculaire et, par conséquent, sont communément appelés «composés bioactifs». Il s'agit notamment de plus de 17.000 molécules antibiotiques dotées d'activités antimicrobiennes, anti-tumorales et / ou antivirales, ainsi que des composés tels que les promoteurs de croissance, les immunosuppresseurs, les herbicides et antiparasitaires. Fait remarquable, environ un tiers de tous les composés bioactifs d'origine microbienne signalé jusqu'en l'an 2002 (~ 7600 sur ~ 22000 métabolites) découlent des espèces appartenant au genre *Streptomyces* [Berdy, 2005]. Selon les estimations prévisionnelles, il s'agit encore que d'une fraction mineur du nombre total des différents composés potentiellement produites par le genre [Watve et al., 2001].

Tableau 14. Nombre approximatif de produits microbiens bioactifs (2002). [Berdy, 2005]

Source	Antibiotiques*	Autres métabolites bioactifs	Total des métabolites bioactifs	Métabolites utilisés (en thérapie humaine)	Métabolites inactifs
Bactéries**	2900	900	3800	10-12 (8-10)	3000 ~5000
Actinomycétales	8700	1400	10100	100-120 (70-75)	5000 ~ 10000
<i>Streptomyces sp.</i>	6550	1080	7630		
Champignons	4900	3700	8600	30-35 (13-15)	2000 ~15000

* : activité antimicrobienne et/ou antitumorale et/ou antivirale.

** : autre que les actinomycètes.

Les *Streptomyces* produisent plus de la moitié des antibiotiques connus à ce jour et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement et déjà exploité dans la thérapeutique humaine [Fig.18]. Parmi ces derniers, on peut citer les céphamycines de *Streptomyces clavuligerus* utilisées contre les bactéries à Gram négatif et positif, l'aminoglycoside kanamycine produit par *Streptomyces griseus* utilisé contre les bactéries Gram négatives. Le polykétide nystatine, produit par *Streptomyces noursei* utilisé comme antifongique pour lutter contre les infections causées par *Candida albicans* ou encore le glycopeptide vancomycine, produit par *Streptomyces orientalis* utilisée dans le traitement des souches de *Staphylococcus aureus* résistantes à la méthycilline (SARM) [Rokem et al. 2007].

Outres les agents antimicrobiens, les *Streptomyces* produisent un grand nombre de métabolites secondaires possédant des structures chimiques et des activités biologiques très variées qui n'existent dans aucun autre genre bactérien.

Les plus connus sont les dérivés d'anthracyclines comme la mitomycine produite par *Streptomyces lavendulae* et utilisé dans le traitement du cancer, des immunosuppresseurs tel que la rapamycine produite par *Streptomyces hygroscopicus* et le FK-506 produit par *Streptomyces tsukubaensis* [Sehgal, 2003 ;

Saunders *et al.*, 2001] utilisés pour prévenir le rejet de greffe d'organe, des inhibiteurs de β -lactamases tel que l'acide clavulanique produit par *Streptomyces clavuligerus*, des antiviraux comme les rifamycines produits par *Streptomyces mediterranei* qui ont montré des propriétés antivirales contre des bactériophages mais aussi des virus de mammifères [Wehrli et Staehelin, 1971] ou encore des insecticides et antiparasitaires tel que les avermectines produite par *Streptomyces avermitilis* [Demain, 1999].

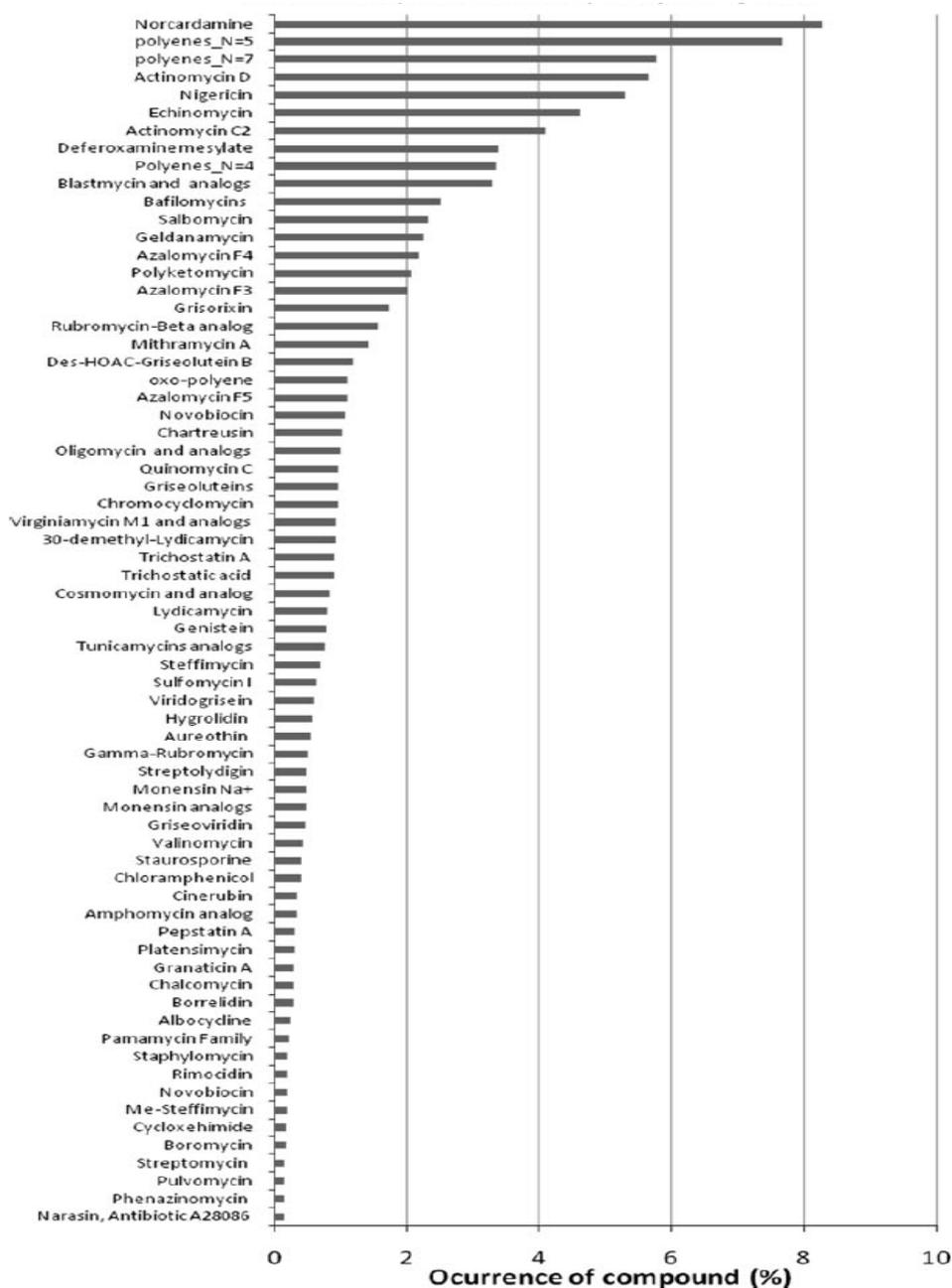


Figure 18. Produits naturels connus mis en évidence dans les extraits du genre *Streptomyces* [Genilloud *et al.*, 2011]

La remarquable diversité des composés biologiquement actifs produits par les *Streptomyces* a pour conséquence l'intérêt des *Streptomyces* dans l'industrie pharmaceutique où les antibiotiques, tiennent une place importante en nombre mais surtout en importance thérapeutique.

Ces antibiotiques sont issus du métabolisme secondaire des *Streptomyces*, au cours de leur cycle de développement une différenciation morphologique s'accompagne d'une différenciation métabolique se traduisant par le passage du métabolisme primaire au métabolisme secondaire. Ce dernier se met en place dans les phases tardives du développement, donnant lieu à la biosynthèse de ces composés. Leur rôle physiologique dans la croissance de ces microorganismes reste encore indéterminé. En effet, ces métabolites secondaires n'assurent pas de fonction vitale pour leur croissance puisqu'ils sont essentiellement synthétisés en phase de déclin de la croissance de la bactérie [Demain, 1999].

Il existe deux grands groupes d'hypothèses sur le rôle biologique de ces métabolites secondaires. Le premier regroupe les hypothèses se ramenant à leur apparition par un processus de sélection naturelle ; entre autres, les antibiotiques joueraient un rôle protecteur lors du processus de différenciation au cours duquel le mycélium primaire se lyse et il est « cannibalisé » par le mycélium aérien, ils serviraient alors à éviter que les produits de la lyse ne soient utilisés par d'autres microorganismes [Hodgson, 2000]. Cependant, ces hypothèses soulèvent un problème majeur sachant que tous les métabolites secondaires ne sont pas des antibiotiques. Le second groupe d'hypothèses considère les métabolites secondaires comme de simples métabolites d'overflow dont les rôles biologiques se sont ensuite révélés [Hodgson, 2000]. Ces métabolites seraient en fait davantage utiles au fonctionnement métabolique de la cellule que pour leurs rôles dans le milieu extérieur. En effet, lorsque la croissance est perturbée ("unbalanced growth") à cause, entre autre, d'une carence en une source nutritionnelle majeure, le métabolisme secondaire pourrait être induit pour ralentir les voies du métabolisme primaire dans l'attente que le milieu soit réapprovisionné en cette source. Les voies du métabolisme central fournissent en effet les précurseurs qui alimentent les voies de biosynthèse des métabolites secondaires [Hodgson, 2000].

Les métabolites secondaires sont habituellement produits à faibles taux de croissance, ce qui suppose des contrôles régulatoires globaux. Les voies du métabolisme secondaire sont également affectées par des phénomènes d'induction, de régulation à la fois catabolique et par le produit final. Le métabolisme secondaire serait donc soumis à deux niveaux de contrôle [Martin et Demain, 1980].

La production de métabolites secondaires est également fortement influencée par les sources nutritionnelles [Onaka *et al.*, 2011]. Parmi ces derniers, les sources de carbone et d'azote jouent un rôle primordial dans l'induction ou la répression de la production de molécules secondaires. L'épuisement de ces sources nutritionnelles pourrait déclencher l'initiation de la synthèse d'antibiotique en permettant de lever la régulation négative exercée par ces nutriments [Martin et Demain, 1980].

La plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques sont hétérotrophes et exigent des composés organiques comme source de carbone et d'énergie. Les sources de carbone telles que l'amidon de maïs, le glucose, le fructose, le saccharose et la mélasse qui sont rapidement assimilés sont couramment utilisés comme substrats de croissance pour produire des métabolites secondaires par fermentation [Sanchez et Demain, 2002 ; Papagianni, 2004]. Le glucose est généralement la meilleure source de carbone et d'énergie pour la croissance de nombreux microorganismes producteurs d'antibiotiques [Park *et al.*, 1994]. Néanmoins, le processus catabolique du glucose peut causer une diminution du taux de biosynthèse de nombreux antibiotiques ; ce phénomène est appelée la répression catabolique [Sanchez et Demain, 2002].

Cette répression du carbone est très courante dans les systèmes microbiens et sa fonction primaire est d'assurer l'organisation et l'utilisation séquentielle des sources de carbone lorsqu'ils sont présents en nombre dans leur environnement. De ce fait, pour limiter les effets de la répression catabolique en culture (notamment en mode Fed-batch), il convient de maintenir les apports en carbone à des taux relativement faibles [Sanchez et Demain, 2002].

L'azote est un élément majeur de la matière vivante doté d'une capacité à gouverner la croissance et la formation d'enzymes cellulaires [Choi *et al.*, 2000]. Il est ainsi l'un des plus importants macronutriments nécessaires à la croissance des microorganismes.

La source d'azote influence également la production d'antibiotiques dont nombreux d'entre-eux possèdent un ou plusieurs atomes dans leur structure. L'azote est introduit dans les milieux de cultures sous formes de sels d'ammonium, de nitrate ou de composés organiques tels que les acides aminés, peptones etc.

La plupart des microorganismes utilisés dans l'industrie peuvent utiliser à la fois les sources d'azote inorganiques (par exemple les sels d'ammonium) et organiques (acides aminés, protéines). Néanmoins, la production de certains antibiotiques peut être inhibée par la présence d'ions ammonium et des sources d'azote rapidement assimilés. Le phénomène est appelé la répression catabolique d'azote par analogie à celle du carbone [Omura *et al.*, 1980]. Dans de tels cas l'utilisation de sources d'azote organique lentement assimilées sont préférés pour encourager la production de métabolites secondaires [Sanchez et Demain, 2002].

II. Résultats :

1. Mise en évidence de l'activité antimicrobienne :

1.1. Choix des microorganismes ciblés :

Pour évaluer le spectre d'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes isolées, nous avons sélectionné plusieurs modèles d'étude comprenant une gamme représentative de bactéries (Gram positive et négative), champignons et levures. Certains de ces microorganismes sont également connus pour être des pathogènes opportunistes sévissant principalement en milieu hospitalier.

Escherichia coli est principalement l'agent d'infections urinaires qui sont les plus fréquentes en termes d'infections nosocomiales, telles que les cystites ou pyélonéphrites. Cette espèce est également responsable entre autres de septicémies (le plus souvent à point de départ urinaires), de méningites, pneumopathies et d'infection de plaies chirurgicales. *E.coli* se caractérise par son aptitude particulière à acquérir des mécanismes de résistance à des antibiotiques tels que les pénicillines et céphalosporines de première et troisième génération comme la cefotaxime, et ceftazidime [Nys *et al.*, 2008].

Staphylococcus aureus est un agent pathogène majeur qui provoque une large gamme de manifestations cliniques, telles que les infections de plaies, pneumonies, septicémies, et endocardites et se place à l'heure actuelle comme l'un des principaux agents d'infections nosocomiales. Les bêta-lactamines constituent les antibiotiques privilégiés pour le traitement d'infections sévères à *S. aureus* [Chambers, 2001], toutefois, depuis l'introduction de la méthicilline en utilisation clinique, l'émergence de souche résistante dites « MRSA » est en constante augmentation. L'espèce MRSA présente en plus une résistance aux fluoroquinolones et aux céphalosporines [Tacconelli *et al.*, 2000 ; Salem *et al.*, 2011].

La prévalence croissante des infections nosocomiales générée par des souches de *Pseudomonas aeruginosa* multi résistantes aux antibiotiques (MDR) compromet gravement la sélection des traitements appropriés et elle est donc associée à une morbidité importante [Cabot *et al.*, 2011]. Agent pathogène opportuniste par excellence, cette espèce est responsable de broncho-pneumopathies, septicémies, infections urinaires et d'infections cutanées [Jacobsen *et al.*, 2011] et possède une extraordinaire capacité pour développer une résistance à presque tous les antibiotiques disponibles. Cette antibiorésistance est le résultat de la sélection de mutations dans les gènes chromosomiques et de la prévalence croissante de déterminants génétiques de résistance transférables [Cabot *et al.*, 2011].

Streptococcus faecalis est l'espèce prédominante des infections nosocomiales à entérocoques [Benachour *et al.*, 2009 ; Del Papa *et Perego*, 2011]. Elle peut être l'agent d'endocardites, d'infections urinaires et cutanées et présente de nombreuses résistances aux antibiotiques comme les aminoglycosides,

céphalosporines, et les pénicillines semi-synthétiques telle que l'oxacilline [Eliopoulos, 2005]. Des souches résistantes à la vancomycine (VRE) sont de plus en plus isolées mais leur fréquence reste à l'heure actuelle relativement faible [Muto *et al.*, 2003 ; Zhneg *et al.*, 2009].

Parmi les micromycètes testés, *Candida albicans* est l'espèce la plus incriminée dans les infections fongiques humaines, elle est responsable d'infections cutanéomuqueuses et visérales localisées ou disséminées ainsi que des candidoses systémiques [Pfaller et Diekema, 2007]. Les résistances de *Candida albicans* aux antifongiques polyéniques tel l'Amphotéricine B sont rares, cependant chez les dérivés azolés, et chez les triazolés tels que le fluconazole ou le voriconazole, on voit apparaître après traitement des souches de *Candida* résistantes à ces produits [Miyazaki *et al.*, 2006 ; Goldman *et al.*, 2004] .

Aspergillus niger est l'agent d'aspergilloses invasives nosocomiales particulièrement au niveau pulmonaires. Cette infection est fréquente chez les patients immunodéprimés ou soumis à des thérapies agressives et son évolution est très fréquemment mortelle [Morgan *et al.*, 2005].

L'espèce *Rhodotorula mucilaginosa* a longtemps été étiquetée comme levure de contamination non pathogène, mais au cours des deux dernières décennies elle s'est révélée comme agent opportuniste d'infections telles que des fongémies, méningites, ventriculites, péritonites, endocardites et même d'ostéomyélites. Des isolats résistants au fluconazole, itraconazole ont même été rapportés [Chabasse *et al.*, 2009 ; Savini *et al.*, 2008].

Bacillus subtilis et *Micrococcus luteus* sont des germes saprophytes, rarement pathogènes opportunistes. Des cas d'infections de type nosocomiale grave sont rarement signalés avec ces deux espèces tel que les endocardites, septicémie et pneumonie [Seifert *et al.*, 1995 ; Sietsche et Diderichsen, 1991].

1.2. Test de l'activité antimicrobienne :

La recherche de l'activité antimicrobienne a été réalisée par la méthode de la double couche en milieu solide. Cette technique permet de mettre en évidence les zones d'inhibitions résultant de la synthèse de molécules antibiotiques sur le même principe que la diffusion en milieu solide. Sur les 10 espèces de *Streptomyces* testés, quatre d'entre-elles ont présenté une activité antibactérienne et/ou antifongique vis-à-vis d'au moins l'une des souches cibles [Fig.19].

Les résultats révèlent que WLN-001 et SLO-105 présentent un profil similaire d'activité antimicrobienne. Les deux espèces possèdent une activité antibactérienne qui se manifeste à l'encontre des cibles Gram positifs testés mais aucune zone d'inhibition n'a été détectée vis-à-vis des bactéries Gram négatif.

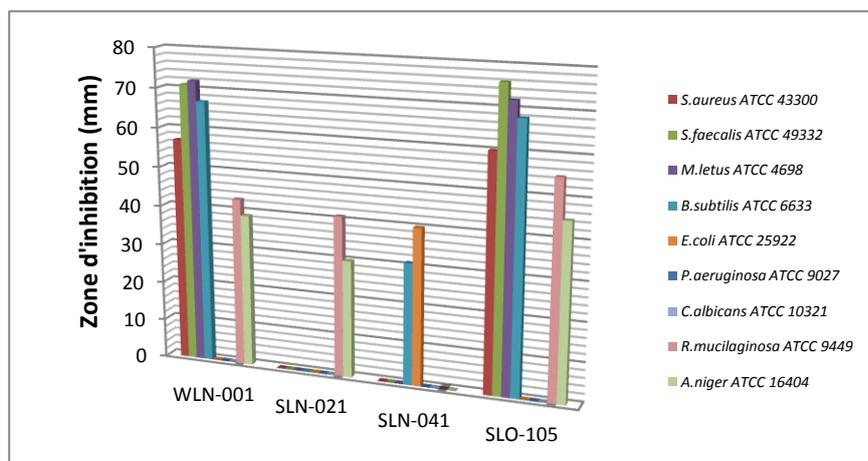


Figure 19. Spectre d'activité des *Streptomyces* isolés.

Les deux espèces présentent également une activité antifongique décelable sur *Rodotorulla mucilaginosa* et *Aspergillus niger* mais aucune activité à l'encontre de *Candida albicans*. SLN-021 présente uniquement une activité antifongique également visible sur *A.niger* et *R.mucilaginosa* tandis que SLN-041 est faiblement active sur *E.coli* et *B.subtilis*.

2. Cinétique de croissance et de production :

2.1. Essai de culture en Erlenmeyer :

Les cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens ont été suivies en culture batch réalisés sur milieu ISP₂ liquide. Des prélèvements quotidiens à intervalle de 24h ont été effectués et ont servi d'une part à la détermination de la biomasse (en poids sec) et d'autre part à mesurer les diamètres des zones d'inhibitions vis-à-vis des microorganismes cibles.

La cinétique de croissance de WLO-001 révèle une croissance rapide pendant les premières 48h de culture [Fig.20]. La vitesse spécifique moyenne de croissance a été estimée à 0.041 h⁻¹ après 48h de culture. La croissance se poursuit entre 48 et 168h de culture avec une augmentation de la biomasse pour atteindre un maximum de 3,44 g/l.

Cependant les vitesses spécifiques de croissance tendent à ralentir durant ce même intervalle avec 0,03, 0.015, 0.007 et 0.0037 h⁻¹ respectivement à 72, 96, 120 et 144h. Au cours de la croissance la souche tend à former des pelotes (agrégats) de couleur jaune tandis que le reste du milieu reste clair.

Les valeurs enregistrées du pH démontrent que durant les premières heures de croissance, on observe une acidification rapide du milieu (pH = 4.19 après 72h de culture). Le pH remonte ensuite progressivement pour atteindre des valeurs basiques en fin de culture (pH= 8.02).

La production de métabolites antimicrobiens débute quant à elle entre 48 et 72h pour atteindre un maximum après 168h de culture et s'accompagne de la production de pigmentation de couleur jaune vif dont l'intensité évolue au cours du processus de production.

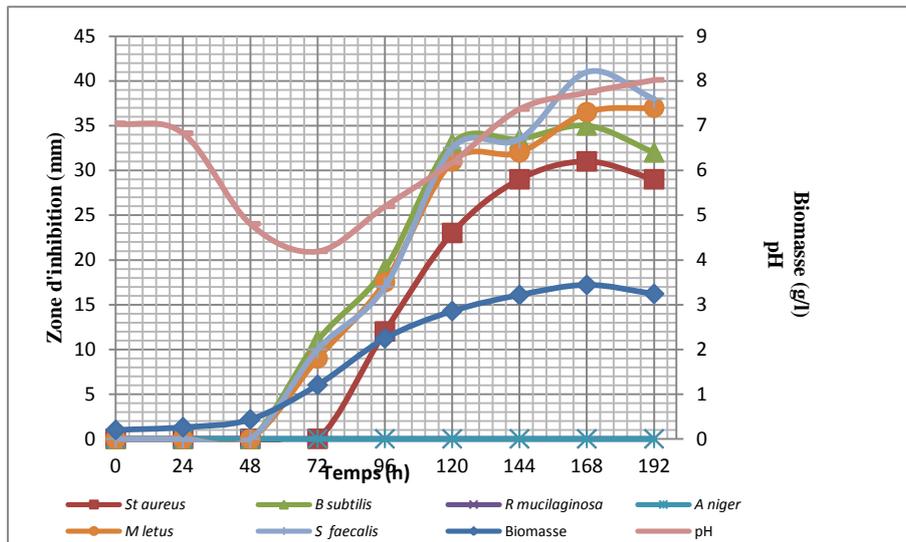


Figure 20. Cinétique de croissance et de production de *Streptomyces* WLO-001 sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

L'activité la plus marquée de l'espèce se manifeste à l'égard de *S. faecalis* et *M. letus* avec respectivement 41 et 36.5 mm de diamètres, *S. aureus* MRSA enregistre les diamètres légèrement plus faible avec une zone d'inhibition de 31 mm. On note que l'activité des filtrats de culture n'a été visible qu'à l'encontre des bactéries cibles testés, en revanche aucune activité antifongique n'a été décelée.

Les résultats de la cinétique de croissance et de production de *Streptomyces* SLN-021 sont consignés dans la figure 21. On observe également une croissance rapide de la souche durant les premières 48h avec une vitesse spécifique de croissance qui atteint 0.051 h⁻¹ et une biomasse estimée à 0.913 g/l. Le taux de croissance observé est plus élevé que celui enregistré avec WLO-001 durant la même période. La biomasse continue de croître jusqu'à 144h de culture pour atteindre un maximum de 3.326 g/l, puis se stabilise en fin de culture. La bactérie se développe en milieu liquide en formant des mycéliums libres de couleur blanchâtre visibles à l'œil nu tandis que le reste du milieu reste également clair.

Parallèlement, nous remarquons un abaissement du pH du milieu qui correspond à la première phase de croissance bactérienne (pH = 4.76 après 48h). Il augmente progressivement pour se rapprocher de la neutralité en fin de culture (pH= 6.96). En ce qui concerne l'activité antifongique de SLN-021, aucune activité à l'encontre d'*Aspergillus niger* et *Rodotorulla mucilaginosa* n'a été observé dans les surnageant de culture.

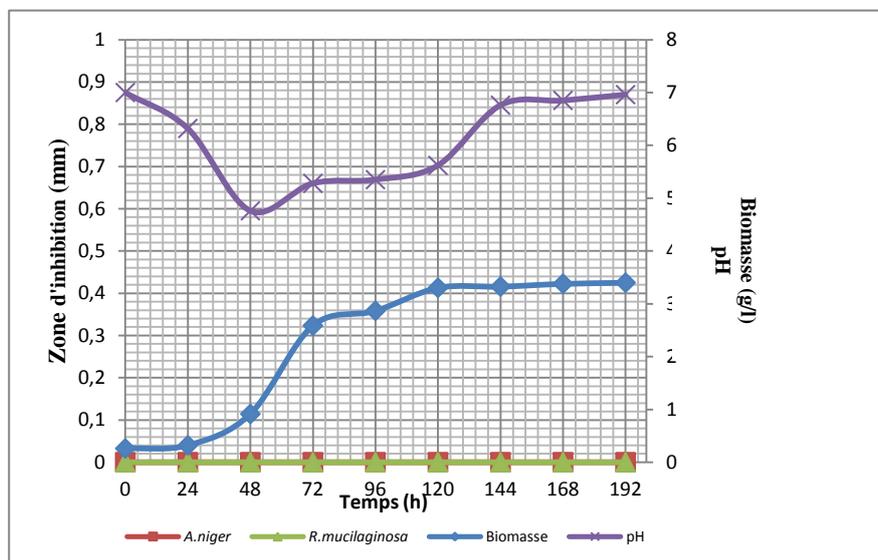


Figure 21. Cinétique de croissance et de production de *Streptomyces* SLN-021 sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

Streptomyces SLN-041 présentes le même aspect que SLN-021 lorsqu'elle est cultivée sur milieu liquide. Sa cinétique de croissance représenté dans la figure 22 suit le même schéma que pour les deux espèces précédentes avec une croissance rapide durant les premières 48 h. Une vitesse spécifique de croissance maximale de 0.026 h⁻¹ est enregistrée après 48h de culture et correspond à 1.02 g/l de biomasse produite. La croissance se poursuit pour atteindre un maximum de 4.43 g/l après 168h de culture.

L'acidification du milieu est observée durant les premières heures de croissance et la production de métabolites antibactériens survient après 48h et 72h de culture respectivement pour *Escherichia coli* et pour *Bacillus subtilis*. Elle atteint un maximum de 12 mm de diamètres pour *E.coli* après 120h, tandis que le maximum est atteint à 168h pour *B.subtilis* avec 10mm de diamètres.

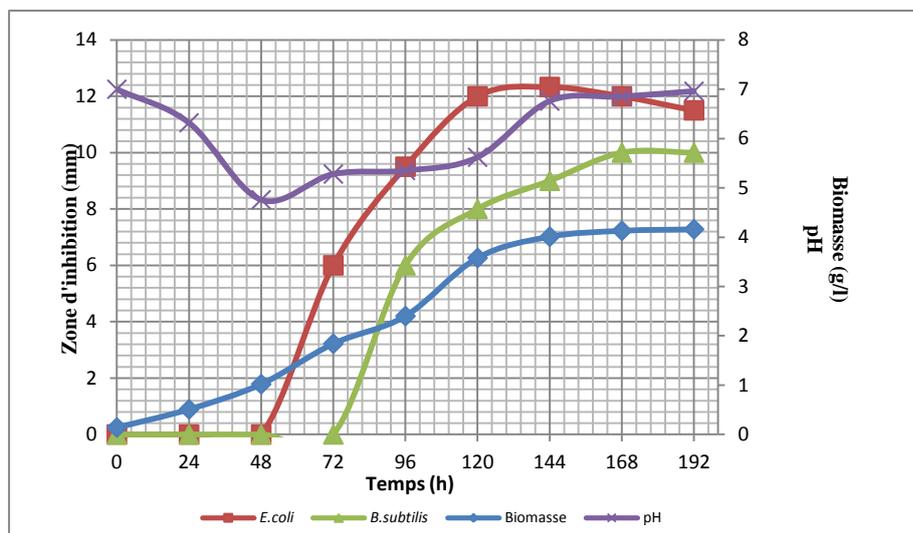


Figure 22. Cinétique de croissance et de production de *Streptomyces* SLN-041 sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

Les vitesses spécifiques de croissance de *Streptomyces* SLO-105 révèlent que la croissance de la souche est plus rapide durant les 24 premières heures avec une vitesse de croissance maximale de 0.030 h^{-1} et qui correspond à une biomasse de 0.35 g/l [Fig. 23]. La croissance se poursuit avec une vitesse plus réduite et le maximum de biomasse est atteint après 144h de culture avec 3.55 g/l .

L'acidification du milieu suit la phase de croissance rapide de la bactérie (phase exponentielle) avec un pH de 4.39 enregistré après 72h de culture. Ce dernier remonte progressivement et marque le début de la production de métabolites antibactériens. Le maximum d'activité antibactérienne est observé après 168h de culture avec *S. faecalis* (30 mm), *M. latus* (28 mm) et *B. subtilis* (21 mm). L'activité est plus faible avec *S. aureus* avec un maximum de 18 mm de diamètres mesuré après 144h de culture. A l'instar de *Streptomyces* WLO-001, aucune activité antifongique n'a été détecté dans les surnageant de culture, la souche croit en formant des floccs de couleur jaune et produit également un pigment de couleur jaune dont la production débute en même temps que celle des métabolites anti bactériens.

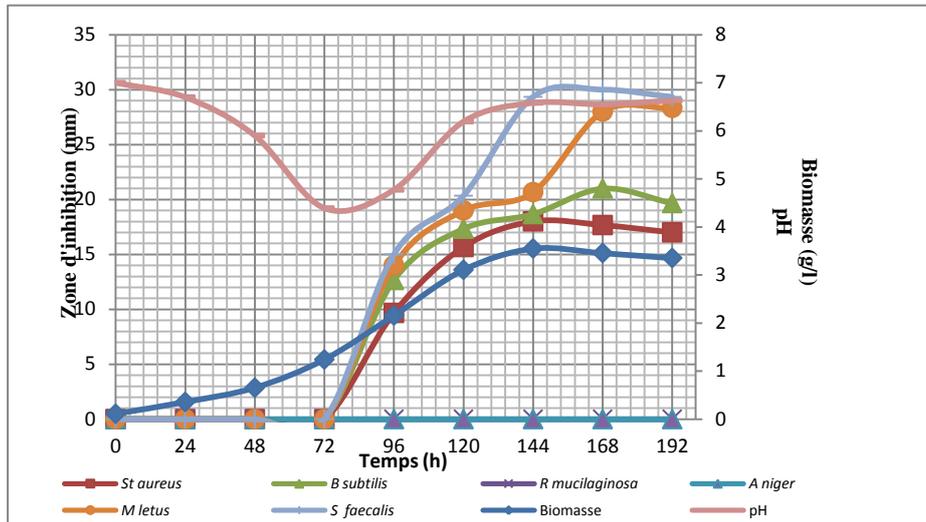


Figure 23 : Cinétique de croissance et de production de *Streptomyces SLO-105* sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

2.2. Culture en bioréacteur :

Les essais de culture en erlen nous ont permis d'observer le comportement des *Streptomyces* étudiées en culture submergée et d'en déterminer certains paramètres cinétique. Des cultures en bioréacteur ont donc été réalisées pour appuyer les résultats obtenus précédemment en corrigeant l'entrée d'oxygène et permettre une lisibilité du métabolisme de ces isolats.

Les cultures ont été réalisées en fermenteur de 1.5 litres, renfermant 1l de milieu ISP₂ ensemencé avec une préculture de 48h réalisée sur le même milieu. Seules *Streptomyces WLO-001*, *SLN-041* et *SLO-105* ont été sélectionnées pour les cultures en fermenteur car elles qui ont démontrées une activité antibactérienne au cours des essais en erlenmeyers.

Globalement les cultures en bioréacteur ont confirmé les résultats précédents. Les souches de *Streptomyces* isolées croient de manière rapide durant les premières 24-48 h avec des vitesses de croissances maximales enregistrées après 24h de culture avec 0.0021, 0.0039 et 0.0043 respectivement pour *Streptomyces WLO-001* [Fig.24] , *SLN-041* [Fig.25] et *SLO-105* [Fig.26]. On observe également l'absence de phase de latence.

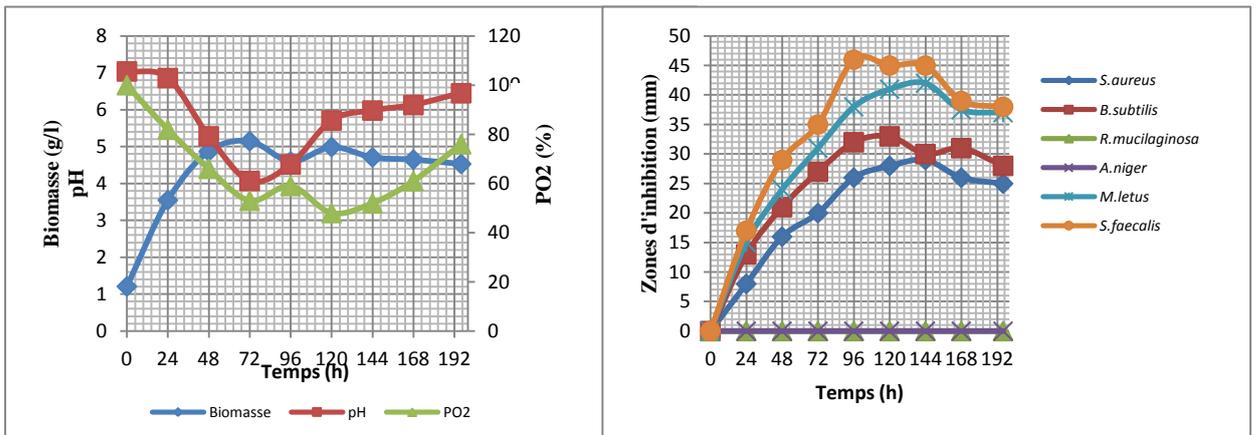


Figure 24. Cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens par WLO-001 en culture batch réalisée en biofermenteur sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

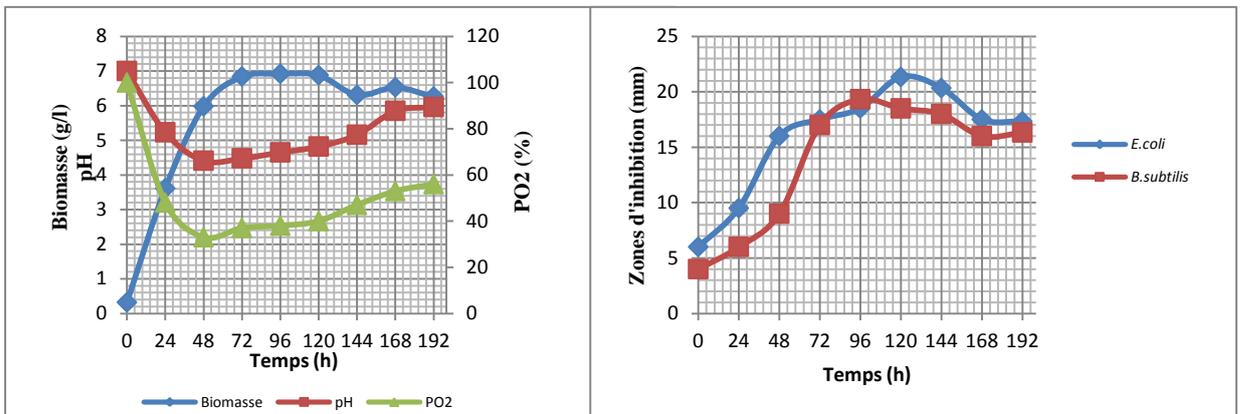


Figure 25. Cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens par SLN-041 en culture batch réalisée en biofermenteur sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

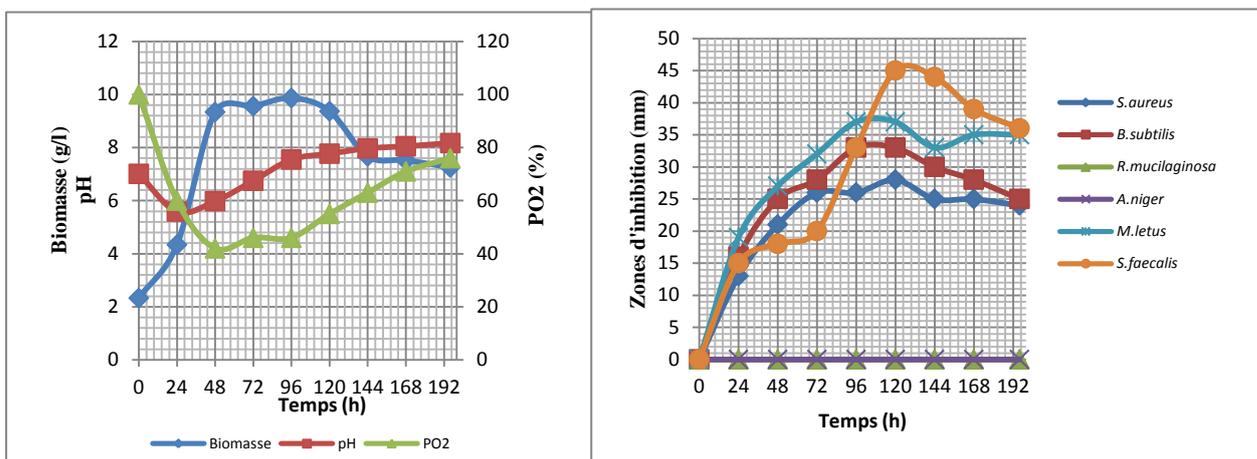


Figure 26. Cinétiques de croissance et de production de métabolites antimicrobiens par SLO-105 en culture batch réalisée en biofermenteur sur milieu ISP₂ à 30°C et sous agitation permanente de 250 rpm.

La croissance en phase exponentielle s'accompagne d'une acidification du milieu qui est plus marquée chez WLO-001 avec un pH égale à 4.07 après 72 h. La croissance s'accompagne également d'une consommation d'oxygène. Cette consommation suit la production de biomasse et elle est plus forte chez SLN-041 où l'on observe une chute rapide de la pression en oxygène durant les premières 72 h pour atteindre un taux de 33 %. Cette forte consommation d'oxygène par *Streptomyces* SLN-041 lui permet de produire une biomasse maximale de 6.92 g/l après 96 h. Cependant la plus forte production en biomasse est enregistrée avec *Streptomyces* SLO-105 avec 9.87 g/l après 96 h de culture et cela sans que la pression en O₂ ne descende sous la barre des 40 %. La phase stationnaire intervient quant à elle entre 48 h et 96 h de culture pour les trois espèces et marque un ralentissement ou arrêt de la croissance.

La production de métabolites antibactériens qui débutent en phase exponentielle atteint des valeurs maximales en fin de phase stationnaire. Les résultats confirme la similitude de profile activités antibactérienne de WLO-001 et SLO-105 avec des valeurs les plus élevées enregistrées vis-à-vis de *Streptococcus faecalis* avec un maximum d'environ 45 mm de diamètres d'inhibition atteint entre 96 h et 120 h de culture. Les zones d'inhibition les plus faibles demeurent celle observées avec *Staphylococcus aureus* avec un maximum de 29 mm de diamètres chez WLO-001 après 144h de culture. Nous notons également que l'activité antifongique de ces deux espèces de *Streptomyces* reste non décelable dans les surnageant de culture ayant servi aux tests d'activités. En ce qui concerne SLN-041, l'activité est plus marquée à l'encontre d'*Escherichia coli* avec un maximum 21.33 mm de diamètres après 120 h de culture.

Au cours du processus de fermentation, nous avons également notées que les *Streptomyces* en culture ont tendance à se fixer sur la paroi du fermenteur au niveau de la butée du liquide en mouvement de même que sur les sondes et le tube servant au prélèvement quotidien. Leur développement a abouti à la formation d'un tapis visible à l'œil nu.

3. Effet de la source de carbone et d'azote sur la croissance et la production de métabolites antimicrobiens :

Le milieu ISP₂ renferme de l'extrait de levure, de l'extrait de malt et du glucose et constitue par conséquent un milieu complexe, source de multiple substrats potentiel pour les *Streptomyces* étudiées : carbohydrates, acides aminés, peptides...etc. Cette abondance de substrats non maîtrisés ne permet pas d'évaluer le besoin en source de carbone et d'azote par les souches étudiées.

3.1. Effet de la source de carbone :

L'effet de la source de carbone sur la croissance et la production de métabolites antibactériens par les souches de *Streptomyces* isolées a été étudié sur milieu basal additionné de 1 % de différentes source de carbone en présence de NaNO₃ comme source d'azote (le glucose étant utilisé comme témoin). La culture a été réalisée pendant 7 jours à 30°C et sous agitation de 250 rpm. Les tests d'activité des surnageant de culture ont été réalisés sur *S.aureus* et *B.subtilis* utilisé comme cibles.

Les résultats de la croissance de *Streptomyces* WLO-001 rapportés dans la figure 27, révèlent que le mannitol se place comme la source de carbone la plus favorable à la croissance avec une biomasse estimée à 1.14 g/l après 7 jours de culture. Le glucose vient en deuxième position avec 1.015 g/l suivi du fructose avec 0.90 g/l. Les croissances les plus faibles sont observées en présence du sorbitol et du lactose avec respectivement 0.095 g/l et 0.085 g/l.

Pour la production de métabolites bioactifs, c'est le fructose qui semble être la meilleure source de carbone avec des zones d'inhibition de 25.5 mm de diamètre pour *B.subtilis* et 22 mm pour *S.aureus*. Il est suivi par le mannitol, le glycérol et le glucose. En revanche, on observe qu'en présence de saccharose, lactose et sorbitol aucune activité antibactérienne n'a été détectée.

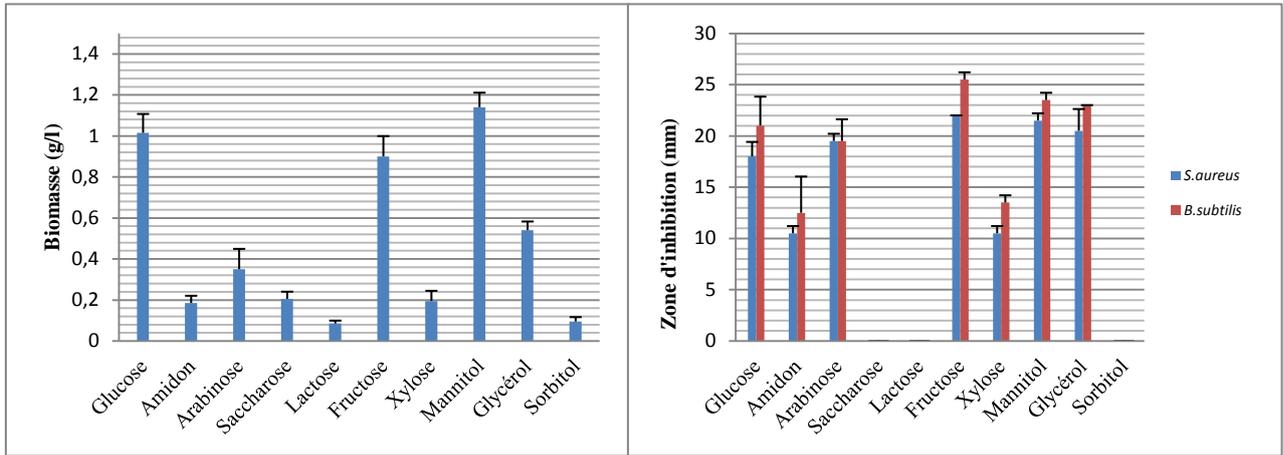


Figure 27. Effet de la source de carbone sur la croissance et la l'activité antibactérienne de *Streptomyces* WLO-001 sur milieu de base additionné de NaNO₃ comme source d'azote.

Pour *Streptomyces* SLN-041 [Fig.28], le glucose, l'arabinose, le mannitol et le glycérol semblent être les plus favorables à la croissance de la souche avec respectivement 2.105, 1.73, 1.52 et 1.315 g/l de biomasse produite. Les autres sources de carbone n'entraînent que de faible croissance.

Bien qu'il produise qu'une faible biomasse, le fructose se place comme la meilleure source pour la production de métabolites actifs à l'encontre d'*E.coli* et *B.subtilis*. Le glucose, le mannitol et le glycérol favorise également l'activité antibactérienne de la souche testée mais aucune activité n'a été notée en présence d'amidon, de lactose et de sorbitol.

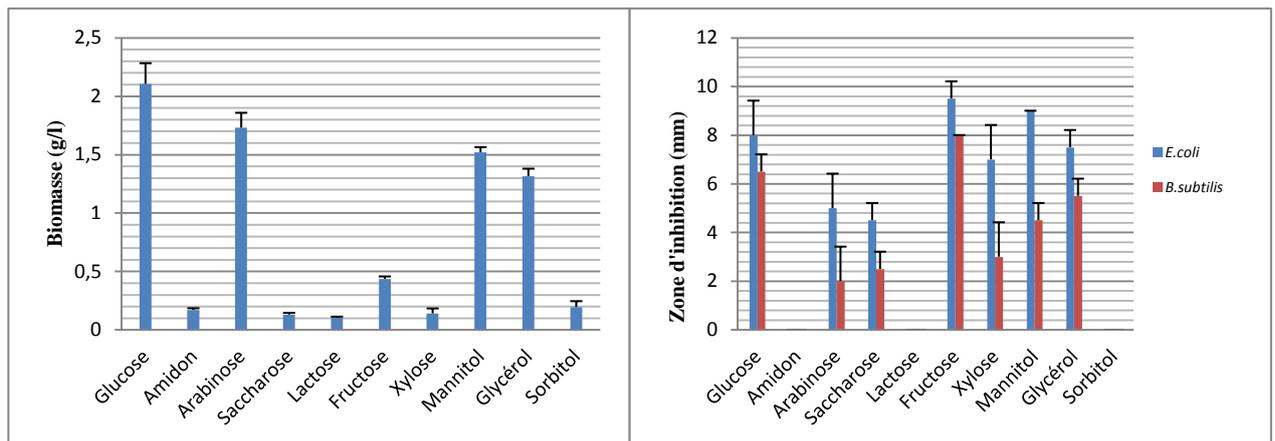


Figure 28. Effet de la source de carbone sur la croissance et la l'activité antibactérienne de *Streptomyces* SLN-041 sur milieu de base additionné de NaNO₃ comme source d'azote.

Streptomyces SLO-105 utilise préférentiellement le mannitol comme source de carbone pour sa croissance et son activité antibactérienne [Fig.29]. La biomasse obtenue a été estimée à 1.55 g/l et des zones d'inhibition mesurées sont de 19 mm pour *S.aureus* et 21 mm pour *B.subtilis*. En matière d'activité antibactérienne le mannitol est suivi du fructose et saccharose mais le biomasse produite par SLO-105 en présence de ces deux derniers est nettement inférieur à celle obtenue avec le mannitol (0.66g/l).

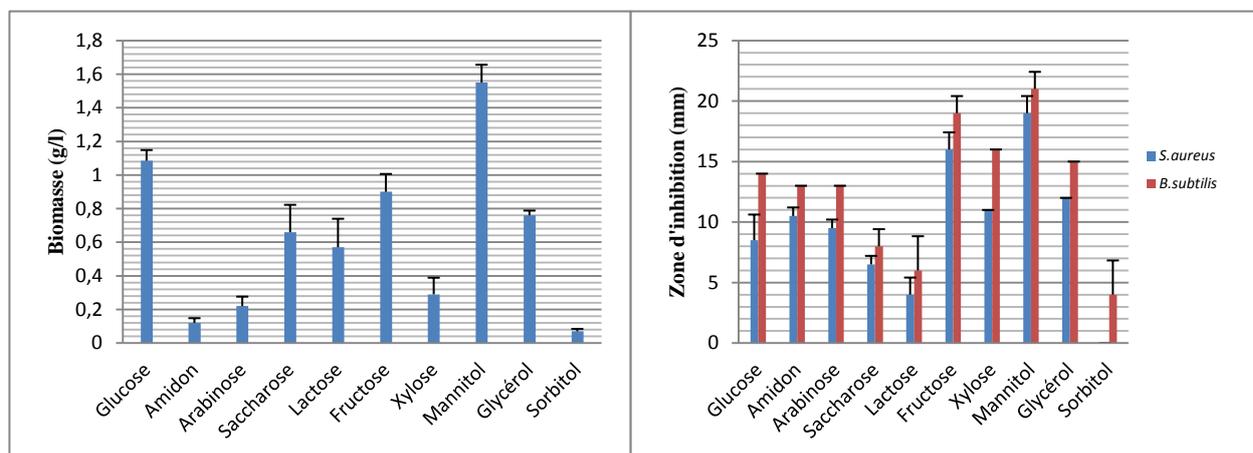


Figure 29. Effet de la source de carbone sur la croissance et la l'activité antibactérienne de *Streptomyces* SLO-105 sur milieu de base additionné de NaNO₃ comme source d'azote.

3.2. Effet de la source d'azote :

L'effet de la nature de la source azote ajouté au milieu de culture à raison de 0.5g/l, a également été étudié sur milieu basal additionné de 1 % de fructose pour WLO-001 et SLN-041 et de mannitol pour SLO-105. Ces sources de carbone ont été sélectionnées au vu des résultats précédents sur la base des diamètres des zones d'inhibitions enregistrés en présence des différentes sources de carbone testés. Dix sources d'azote (4 sources minérales et 6 acides aminés) ont été étudiées et le NaNO₃ a été utilisé comme témoin.

Pour *Streptomyces* WLO-001 [Fig.30], la proline semble être la source d'azote qui donne le plus de biomasse avec 4.74g/l en 7 jours de culture. Elle est suivie par l'asparagine (2.905g/l) et l'acide glutamique (1.935g/l). Les biomasses les plus faibles sont obtenues en présence de Méthionine et Arginine avec respectivement 0.44 et 0.68 g/l.

Le NaNO_3 reste la meilleure source pour la production de métabolites antibactériens lorsqu'il est additionné au fructose avec des zones d'inhibition de l'ordre de 19 mm vis-à-vis de *B.subtilis* et 17 mm pour *S.aureus*. La proline favorise également l'activité antibactérienne avec 17 mm de diamètres pour *B.subtilis* et 16 mm pour *S.aureus*. En revanche aucune activité n'a été observée en présence d'arginine, méthionine et asparagine.

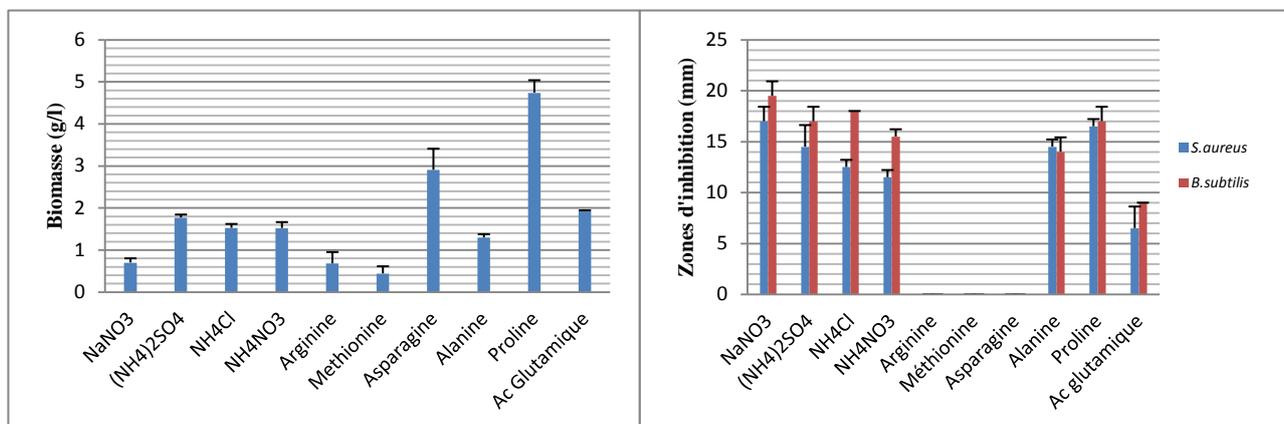


Figure 30. Effet de la source d'azote sur la croissance et la l'activité antibactérienne de *Streptomyces* WLO-001 sur milieu de base additionné de Fructose comme source de carbone.

En présence de fructose comme source de carbone, l'acide glutamine et la méthionine se révèlent les sources d'azotes les plus favorables la production de biomasse par *Streptomyces* SLN-041 avec respectivement 4.415 et 3.8 g/l produit [Fig.31]. Ils sont suivi des sources d'azotes inorganiques qui globalement enregistre une bonne croissance avec des valeurs comprises entre 3.19 g/l pour le $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ et 2.56 g/l pour le NH_4Cl .

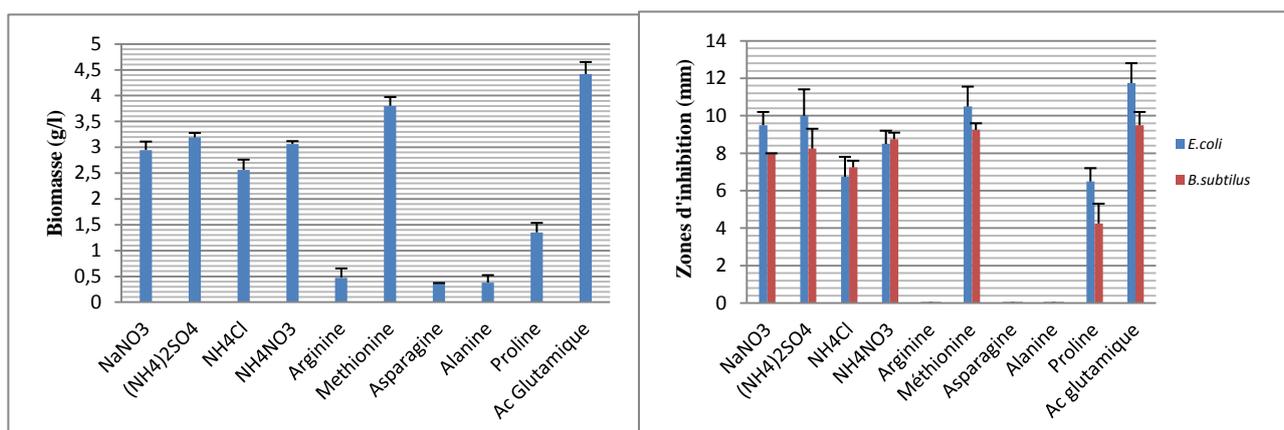


Figure 31. Effet de la source d'azote sur la croissance et la l'activité antibactérienne de *Streptomyces* SLN-041 sur milieu de base additionné de Fructose comme source de carbone.

La proline se présente également comme la source d'azote la plus favorable à la croissance de SLO-105 avec une biomasse estimée à 1.975g/l [Fig.32]. La méthionine et l'asparagine ne semble pas être favorable à la croissance de la souche et produisent respectivement que 0.16 et 0.105 g/l. L'activité antibactérienne de la souche semble être favorisée plus la majorité de sources azotées testées avec des valeurs maximales obtenues en présence d'urée, en revanche aucune activité n'a été observée avec l'arginine et l'asparagine.

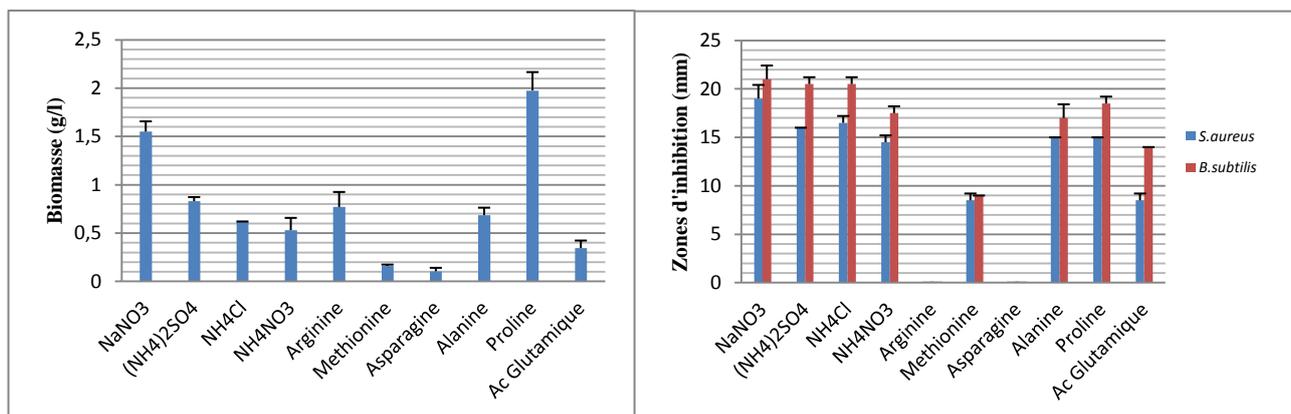


Figure 32. Effet de la source d'azote sur la croissance et la l'activité antibactérienne de *Streptomyces* SLO-105 sur milieu de base additionné de mannitol comme source de carbone.

III. Discussion :

La recherche d'activités antimicrobiennes sur milieu solide des *Streptomyces* isolées au niveau des sédiments et eaux du lac Oubeira a permis de mettre en évidence l'activité de quatre d'entre-elles vis-à-vis des bactéries, levures et moisissures testées. *Streptomyces* WLO-001 et SLO-105 ont révélés une activité antibactérienne similaire exercé exclusivement sur les bactéries Gram positif y compris l'espèce *Staphylococcus aureus* MRSA. L'activité antifongique s'est quant à elle manifestée à l'égard d'*Aspergillus niger* et *Rodotorulla mucilaginosa* mais pas à l'encontre de *Candida albicans*. L'étude phylogénétique de ces deux espèces a révélée l'apparenté de WLO-001 à *S.daejeonensis*, espèce dont aucune information n'est encore disponible. En revanche, SLO-105 a été rapprochée à *S.galbus* connu pour synthétiser la Dihydroindanomyicine antibiotique actif à l'égard des bactéries Gram positif ainsi que la Galbonolide A, qui est un antibiotique de la famille des macrolides ayant une activité antifongique [Frommer, 1959] mais également la Streptomycine [Efremenkova et al., 1977].

WLO-021 a démontré une activité exclusivement antifongique également mise en évidence à l'encontre d'*A.niger* et *R.mucilaginosa*. Cette espèce est génétiquement proche de *Streptomyces aldersoniae* anciennement *S.hygroscopicus* capable de produire entre autre la rapamycine connue pour ces propriétés antifongique et antitumorale [Lee et al., 1997] ainsi qu'un autre antifongique, la Validamycine [Liao et al., 2009]

SLN-041 a manifesté une activité antibactérienne vis-à-vis de bacilles Gram négatif et positif *Escherichia coli* et *Bacillus subtilis*. Aucune activité n'a été détecté à l'encontre de *Pseudomonas aeruginosa* ni à l'égard de cocci Gram positif. L'espèce SLN-041 n'a également pas démontré d'activité antifongique vis-à-vis des micromycètes cibles. Cette espèce a été apparenté à *S.argillaceus* connu pour produire notamment la Mithramycine douée d'activité antitumorale [Lombo et al., 1999].

L'étude des cinétiques de croissance réalisée en culture submergé en mode Fed-bath a démontré une croissance rapide (a comparé avec la culture sur milieu liquide) durant les premières 24-48h de culture pour toutes les espèces de *Streptomyces* avec une absence de phase de latence. L'adaptation rapide des bactéries au milieu de fermentation pourrait s'expliquer par le faite que la suspension de spores ayant servi d'inoculum provient d'une culture des bactéries sur le même milieu. Il en résulte que les *Streptomyces* ont déjà synthétisés les enzymes nécessaires à la l'utilisation des éléments nutritifs du milieu.

Au-delà des 48-72h de culture, la biomasse continue lentement à augmenter dans le milieu, cependant, les vitesses spécifiques de croissance marquent un ralentissement de la croissance. Selon Martin et Demain (1980), la séparation entre la phase exponentielle de croissance et phase stationnaire n'est pas toujours claire dans le cas des cultures de microorganismes filamenteux. La matière sèche (Biomasse) continue en

effet à augmenter significativement en phase stationnaire même si cela se produit à un taux plus faible. Ceci s'explique par le fait que la masse de la cellule consiste en la masse des macromolécules nécessaires à sa réplication, mais également en matière de réserves. Il en résulte que ce type de croissance est non répliquative et provient uniquement d'accumulation de polymère de réserve. Ceci est corroboré par les cultures réalisées en biofermenteur où l'on observe durant les premières 24-72h une chute notable de la pression en oxygène (PO_2) dans le milieu et qui correspond à la phase de multiplication cellulaire (phase exponentielle de croissance) avec une consommation accrue d' O_2 . La pression en oxygène remonte progressivement au-delà des 72h de culture et marque ainsi un net ralentissement de la croissance.

La production de métabolites antimicrobiens s'est révélée à partir de 48 h de culture et coïncide avec un ralentissement de croissance bactérienne ; les concentrations les plus élevées sont atteintes en fin de phase stationnaire. Selon Bu 'Lock (1975), les métabolites secondaires sont généralement formés lorsque le taux de croissance des microorganismes atteint une valeur seuil, le plus souvent faible. Trilli *et al.* (1987), ont démontrés qu'en culture continue, la synthèse d'un antibiotique est optimale si le taux de croissance est maintenu entre 50 et 80% du taux de croissance maximal de la cellule. En effet, de nombreuses études ont révélés que les production d'antibiotiques tel que la Céphamycine C de *Streptomyces cattleya* et l'actinorhodine chez *Streptomyces coelicolor* sont soumises à une régulation par un faible taux de croissance [Doull et Vining, 1990 ; Lilley *et al.*, 1981].

Les limitations nutritionnelles semblent également induire le passage en phase de production. Selon Wang *et al.* (1979) ces dernières peuvent provoquer l'induction d'enzymes des métabolismes secondaires ou libérer les gènes du métabolisme secondaire de la répression catabolique. Demain (1974) explique le retard dans la formation de métabolites comme un mécanisme qui empêchent le «suicide» des microorganismes producteur d'antibiotiques. Au début de la phase de croissance (Trophophase), la plupart des micro-organismes sont sensibles à leur propre antibiotique. Toutefois, au cours de production (Idiophase), ils deviennent physiologiquement résistants à l'antibiotique qu'ils produisent. La faible production de métabolites en phase exponentielle pourrait également s'expliquer par une limitation en précurseurs pendant cette phase. La production des métabolites secondaires étant sous l'influence du métabolisme primaire [Drew et Demain, 1977]. Les cinétiques de croissance et de production montrent également une distinction entre la trophophase et l'idiophase qui est une caractéristique des actinomycètes où la phase de production est découplé de la phase de croissance. Ce même résultat a été observé chez de nombreuses espèces de *Streptomyces* dont *S. ambofaciens* [Khaoua *et al.*, 1992].

Fait marquant des fermentations en milieu liquide, on constate aucune activité antifongique dans les surnageant de cultures de *Streptomyces* WLO-001, SLN-021 et SLO-105. Sachant que les résultats obtenus en milieu solide révèlent une activité antifongique des ces souches, on peut supposer que le métabolite doué d'activité antifongique serait autres que celui actif sur les bactéries tests et que sa production

pourrait être inhibé ou réprimé en culture submergée. Sachant que le même milieu a été utilisé pour la mise en évidence de l'activité antimicrobienne et l'étude des cinétique de croissance, se sont donc les conditions de culture submergée tel que l'aération et l'agitation qui ont pu avoir un effet inhibant sur le métabolisme secondaire des espèces étudiées. L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Il a été rapporté par Mellouli *et al.* (2004), que pour *Streptomyces* TN58, la meilleure production de molécules bioactives est obtenue à une agitation comprise entre 200 et 250 rpm. Pour des agitations faibles de l'ordre de 100 rpm ou fortes au voisinage de 300 rpm, la production de biomolécules chute fortement. De plus, en milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium primaire, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement [Hodgson, 1992], Il existerait donc une possibilité de relation entre la sporulation de l'espèce et sa capacité à produire ces molécules antifongiques.

En culture submergée, les souches de *Streptomyces* ont exhibés une croissance sous forme de filaments libres pour SLN-021 et SLN-041 ou de floccs (agrégats) pour WLO-001 et SLO-105. Ce mode de croissance est très observé chez de nombreux *Streptomyces* lorsqu'ils sont cultivé en culture submergée. Lawton *et al.* (1989), ont examiné 49 souches de streptomycètes et ont constaté que chaque souche pourrait produire une ou plusieurs formes morphologiques y compris des granules compacts (épineux ou pellets moelleux), des pastilles oblongues, des flocons, des agrégats ou encore des mycéliums dispersés et fragmentés. Cependant, sur un aspect macroscopique, un niveau de distinction est fait entre la forme de croissance filamenteuse où les hyphes sont librement dispersés dans le milieu, et la forme granules, où le mycélium se développe sous forme d'agrégats sphériques comprenant un réseau d'hyphes hautement intriqués [Znidarsic et Pavko, 2001]. Cette grande variation morphologique est en partie sous l'influence de nombreux paramètres tels que la nature des sources nutritionnelles, l'aération du milieu et l'agitation [Papagianni, 2004].

Outre l'action exercée par les sources nutritionnelles sur la morphologie des *Streptomyces*, elles interviennent également dans leur processus métabolique et conditionnent leur développement et la production de métabolites secondaire. Les essais réalisés pour déterminer l'effet de la source de carbone sur le métabolismes des souches isolées, révèlent que dans l'ensemble les glucides tel que le glucose, le fructose et le mannitol supportent une bonne croissance des souches ce qui semble indiquer une préférence pour les hexoses (sucre à 6 atomes de carbone) à l'exception du sorbitol sucre très lentement métabolisé par les microorganismes.

En revanche, les disaccharides tels que le lactose et le saccharose donnent une biomasse plus faible de même que les polysaccharides comme l'amidon. Dans une étude sur l'utilisation des sources de carbone et d'azote par *Streptomyces kanamyceticus*, Pandey *et al.* (2005) ont mis en évidence l'effet négatif exercé par

l'ajout de saccharose ou d'amidon dans le milieu sur la croissance et la production d'antibactériens. Ces données peuvent s'expliquer par le fait que plus la molécule glucidique est complexe, plus son assimilation implique un coût énergétique important pour la cellule bactérienne et se traduit par une faible production en biomasse. Les pentoses (arabinose et xylose) et trioses (glycérol) testés donnent eux des quantités intermédiaires en biomasse.

Les hexoses demeurent de bonne source de carbone pour la production de métabolites antibactériens, le fructose et le mannitol semble en être les plus favorables. Ces résultats sont en accord avec de nombreux travaux qui présentent ces deux sucres comme d'excellente source de carbone pour la production de métabolites secondaire. En effet, Kojima *et al.* (1995) ont démontré qu'un milieu défini renfermant le fructose comme source de carbone augmentait considérablement la production de la rapamycine par *Streptomyces hygroscopicus*. De même Dekleva *et al.* (1985) on pu améliorer la production de l'antracycline par *Streptomyces peucetius* en présence de fructose. Thakur *et al.* (2009) ont mis en évidence l'effet positif du mannitol sur la production de métabolites antimicrobiens par une souche de *Streptomyces* nouvellement isolée. Dans notre étude, les disaccharides et polysaccharides présentent des résultats variables selon les souches mais restent dans l'ensemble peu favorable à la production de métabolites.

En ce qui concerne les sources d'azote, on note que les acides aminés testés sont plus ou moins favorables à la croissance et la productivité des *Streptomyces*. Dans de nombreuses études, la production de métabolite est meilleure en présence de source d'azote organique tel que les acides aminées car ils supportent une croissance lente et une assimilation progressive de l'azote [Lebrihi *et al.*, 1992].

La proline acide aminées aromatique s'est révélée être une excellente source de croissance et de production chez WLO-001 et SLO-105. L'effet positif de la proline a déjà été observée chez *Streptomyces griseus* pour la production de la streptomycine [Dulaney, 1948] et Chez *Streptomyces venezuelae* pour la production du chloramphénicol [Shapiro et Vining, 1985 ; Chatterjee *et al.*, 1983]. Michael et Christopher (2002) et Thomas *et al.* (2002) ont démontrés que la proline favoriser la biosynthèse de la coumermycine A, la chlorobiocine et la pyoluteorine en raison de sa transformation en noyau pyrrol présent dans la structure chimique de ces antibiotiques.

L'acide aspartique et l'acide glutamique stimulent également la croissance de WLO-001. Li *et al.* (2007) ont mis en évidence l'effet positif exercé par l'acide glutamique chez *Streptomyces lydicus* pour la production de la Streptolydigin. Selon Gonzalez *et al.*, (1995) Le glutamate est le fournisseur de l'azote pour la biosynthèse de 85% des composés azotés de la cellule. L'acide aspartique stimule la production des Céphamycines par *Streptomyces clavuligerus* et *Streptomyces lactamadurans* [Aharanowitz et Demain, 1979 ; Brana *et al.* 1985 ; Castro *et al.* 1985] ainsi que la Gilvocarcine par *Streptomyces arenae* [Byrne et Greenstein, 1986]. Ces deux acides aminés sont considérés comme des sources riches en azote et sont utilisés préférentiellement par la cellule [Da Silva *et al.*, 2001].

Chez SLN-041 c'est la méthionine et l'acide glutamique qui se placent comme les plus favorables à la production de biomasse et de métabolites actifs. La méthionine est bien connue pour son effet stimulateur sur la biosynthèse de la céphalosporine C, par *Cephalosporium acremonium* [Martin et Demain, 1980]. L'effet positif de la méthionine peut s'expliquer par le fait que ce dernier, par transulfuration réverse, peut être transformé en cystéine, acide aminé sulfuré, qui stimule la production de nombreux antibiotiques possédant un atome de soufre dans leur structure comme les pénicillines et céphalosporines [Martin et Aharonowitz, 1983]. Chez WLO-001, la méthionine semble au contraire exercer une inhibition pour la production de métabolites antibactériens. Plusieurs chercheurs ont signalé que la méthionine réprime sévèrement la production d'un certain nombre de métabolites secondaires tel que la rapamycine par *Streptomyces hygroscopicus* [Kim et al., 2000].

L'effet négatif exercé par certains acides aminés comme que l'arginine ou l'alanine sur la production d'antibiotique peut être attribué à l'ammonium produit par leur catabolisme. En effet, suivant les voies métaboliques empruntées (désamination ou transamination) et l'état nutritionnel en azote de la cellule, le catabolisme des acides aminés peut entraîner une production excessive en ammonium [Lounes et al. 1995]. Des concentrations importantes en ammonium répriment certaines enzymes de dégradation des acides aminés impliquées dans la production de précurseurs indispensables à la biosynthèse d'antibiotiques [Omura et al., 1983].

Par ailleurs, les sources inorganiques d'azote comme les sels d'ammonium supportent une bonne croissance bactérienne et entraînent également une bonne production en métabolites secondaires. Des travaux ont démontrés que l'addition d'ammonium au milieu de culture augmente la production de certains métabolites secondaires tels que la streptomycine, la néomycine et la gentamicine [Gonzalez et al., 1995]. Cet effet positif serait essentiellement dû à la conversion de l'ammonium en glutamine utilisée dans la formation des précurseurs [Gonzalez et al., 1995].

Chapitre 3. Extraction, purification et spectroscopie des molécules bioactives produites.

I. Introduction

La grande majorité des métabolites synthétisés par les *Streptomyces* peuvent être regroupés en fonction de leur origine biosynthétique en trois principales classes de composés : le type peptidique, les lactones macrocycliques et les quinones et dérivés. [O'Cleirigh *et al.*, 2005 ; Pannagiotou *et al.*, 2008].

En fonction de leur structure, les antibiotiques exhibent une large variété de classe chimique : Les Tétracyclines comme l'Oxytétracycline de *S.rimosus* [Findlow *et al.* 2003, Zhang *et al.*, 2006] , les macrolides tel que Erythromycine (*S. erythrea*) [Cortes *et al.*, 1990 ; Carreras *et al.*, 2002] , les inhibiteur de β -lactamine comme l'acide clavulanique de *S. clavuligerus* [Demain *et Piret*, 1991], les aminoglycosides tel que la Streptomycine (*S.griseus*) [Ohnuki *et al.* 1985 ; Gharaibeh *et al.* 2003] , les peptides comme l'Actinomycine C (*S.antibioticus*) [Jones *et Hopwood*, 1984], ou encore les aminonucléosides comme la puromycin isolées de *S. alboniger* [Vara *et al.* 1988, Starck *et Roberts*, 2000]. Un grand nombre d'entre eux ont pour cible la biosynthèse et le maintien de la paroi cellulaire, d'autres inhibent la synthèse protéique en agissant sur les ribosomes bactériens et certains agissent par inactivation des ARN polymérase et topoisomérases qui se traduit par un blocage de la synthèse des acides nucléiques [Walsh, 2000].

Les antifongiques issus des *Streptomyces* utilisée actuellement en clinique sont essentiellement de structure polyéniques caractérisés par un cycle lactone et une chaîne carbonée avec des doubles liaisons conjuguées [Accoceberry *et Noël*, 2006]. Les plus connus sont l'amphotéricine B de *Streptomyces nodosus* [Caffrey *et al.*, 2001] et la nystatine de *Streptomyces noursei* [Fjærvik *et Zotchev*, 2005]. Ces substances ne sont pas sans inconvénients : problèmes de solubilité ou de toxicité, instabilité à la lumière, thermosensibilité qui limite leur également leur utilisation contre des champignons phytopathogènes [warnok *et Speller*, 1982 ; Gupta, 2001].

D'autres antifongiques ont également été isolés de Streptomycètes comme la natamycine et pimarinine de *Streptomyces natalensis* mais dont l'utilisation se limite aux mycoses localisées. De même que la cyclohexémides isolée de *Streptomyces griseus* active sur *Cryptococcus neoformans* [Chabasse *et al.*, 2009].

La détermination de la structure chimique d'un agent antimicrobien passe nécessairement par l'application de plusieurs techniques spectroscopiques. Les spectres obtenus en UV-visible, Infrarouge ou Résonance magnétique électronique permettent d'élucider la nature chimique de la molécule à savoir sa masse, sa géométrie dans l'espace, sa polarité, etc. Ces techniques sont complémentaires et généralement l'élucidation de la structure chimique de la molécule recherchée est obtenue par la combinaison de leurs résultats. La spectrographie infrarouge indique les fonctions présentes et apporte quelques

renseignements sur la nature des groupes carbonés, la spectroscopie dans l'ultraviolet, plus spécifique des doubles et triples liaisons et la spectrométrie de résonance magnétique nucléaire permet de différencier soit les protons ($^1\text{H RMN}$), soit les carbones, ($^{13}\text{C RMN}$) selon leur environnement [Milcent, 2007].

La spectroscopie d'absorption dans l'UV et le visible est une méthode très largement utilisée pour l'analyse qualitative ou quantitative de composés chimiques, l'étude des spectres d'un grand nombre de molécules a permis d'établir des corrélations entre structures et maxima d'absorption. Cette technique est basée sur la propriété des molécules d'absorber des radiations lumineuses de longueur d'onde déterminée. Le domaine UV-visible s'étend environ de 175 à 800 nm (400-800 nm dans le visible).

L'absorption observée dans le domaine de l'UV-visible, est caractérisée par sa longueur d'onde λ_{max} en nm (ou en nombre d'onde, cm^{-1}) et par son intensité reliée au coefficient d'extinction molaire ϵ_{max} . Le maximum d'absorption correspond à la longueur d'onde de la radiation qui provoque une transition électronique dans la molécule. En effet, les électrons de valence contenus dans une molécule peuvent généralement être trouvés dans l'un des trois types d'orbite des électrons : Les simples orbitales liantes ou σ (électron libre) ; les orbitales liantes π (doubles ou triples liaisons) et les orbitales non-liantes (paire électrons libre). Les orbitales liantes σ ont tendance à être plus faible en énergie que les orbitales liantes π , qui sont à leur tour moins énergétique que les orbitales n non-liantes [Fig.32].

Lorsque le rayonnement électromagnétiques de la fréquence correspondante est absorbée, une transitions se produit à partir de l'une de ces orbitales. Seules les transitions Transition $\pi \rightarrow \pi^*$ et Transition $n \rightarrow \pi^*$ peuvent être observé en spectrophotométrie UV-Visible [Krausz *et al.*, 2008]. Les transitions de type $\pi \rightarrow \pi^*$ se produisent chez les composés possédant une double liaison isolée et conduit à une forte bande d'absorption vers 165-200 nm. Les transitions de type $n \rightarrow \pi^*$ ont lieu dans le cas des molécules comportant un hétéroatome porteur de doublets électroniques libres appartenant à un système insaturé.

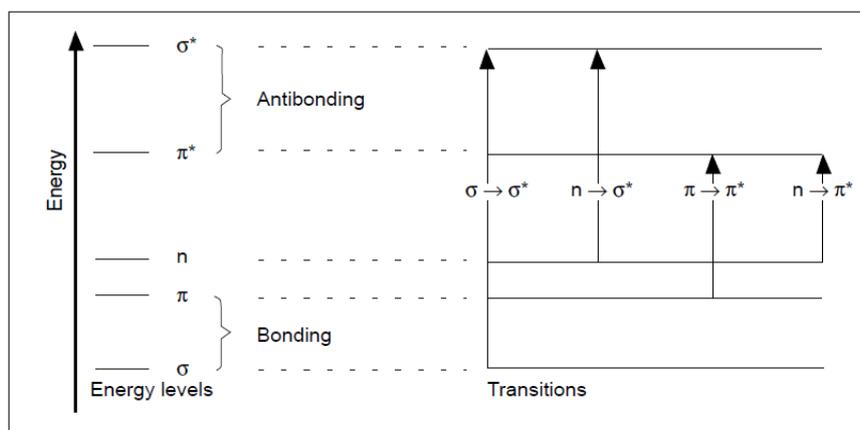


Figure 32. Transition électronique en spectrophotométrie UV-Visible.

L'absorption d'un photon dans le domaine UV-visible peut souvent être attribuée à des électrons appartenant à de petits groupes d'atomes appelés chromophores (C=C, C=O, C=N, C≡C, C≡N). Il existe un certain nombre de chromophores "élémentaires" qui absorbent l'UV à des longueurs d'ondes variées [Tab.15].

Tableau 15. Maxima d'absorbance de chromophores élémentaires en spectroscopie UV. Visible [Janin, 1985].

Chromophores élémentaires	λ max (nm)	ϵ max (L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹)
> C = O (cétone)	290	16
- CH = O (aldéhyde)	279	15
- COOH (acide)	208	32
- COCl (chlorure d'acide)	220	100
- CONH2 (amide)	220	63
- COOR (ester)	211	57
- NO2 (nitro)	214	17
- N = N - (azométhane)	338	4

La présence dans une même molécule de plusieurs de ces chromophores peut se traduire soit par une simple additivité si ces chromophores sont indépendants, soit par des effets bathochromes (déplacement vers les plus grandes longueurs d'onde en UV ou vers le visible) et hyperchromes (augmentation du coefficient d'absorption moléculaire) lorsque ces chromophores sont conjugués. C'est le cas des systèmes diéniques, polyéniques [Tab.16] et aromatiques (plusieurs liaisons >C=C<) ou résultant de la conjugaison de chromophores différents. Ces interactions obéissent à des règles qui permettent de prédire la zone d'absorption maximale.

Tableau 16. Maxima d'absorbance des structures polyéniques en spectrophotométries UV.Visible
 [Lindenfelser *et al.* 1964]

Structure polyénique	Maximum d'absorption (nm)
Tetraènes	290-291
	303-306
	318-320
Pentaènes	318-324
	333-338
	346-358
Hexaènes	339-341
	356-358
	377-380
Heptaènes	358-365
	376-380
	399-405

Le déplacement bathochrome est à l'origine de la couleur de nombreux composés naturels dont les formules semi-développées présentent des chromophores conjugués étendus. Ainsi la couleur orangée du β -carotène, provient de la réunion de onze doubles liaisons conjuguées: $\lambda_{max} = 497$ et 466 nm (dans le chloroforme). Pour les composées aromatiques polynucléaires, plus le nombre de cycles condensés augmente, plus l'absorption se déplace vers de plus grandes longueurs d'onde jusqu'à ce qu'elle atteigne la région du visible [Janin, 1985].

La spectroscopie Infra rouge basée sur l'absorption d'un rayonnement infrarouge par le matériau analysé. Elle permet via la détection des vibrations caractéristiques des liaisons chimiques, d'effectuer l'analyse des fonctions chimiques présentes. Cette technique repose sur le principe que lorsqu'une molécule, présentant un ensemble d'états d'énergie, est soumise à une radiation, elle va absorber de l'énergie pour passer d'un état d'énergie inférieur à un état d'énergie supérieur [Davies, 1998].

La lumière infra-rouge va être absorbée sous la forme de variations vibrationnelles et rotationnelles au sein de la molécule. Deux types de vibrations peuvent être identifiés [Fig.33]: l'élongation dans laquelle deux atomes s'éloignent l'un de l'autre et la déformation qui entraîne une modification des angles de

liaison et qui comprend le cisaillement, le balancement, le hochement et la torsion [Wilmet, 2000 ; Sinnaeve, 2001].

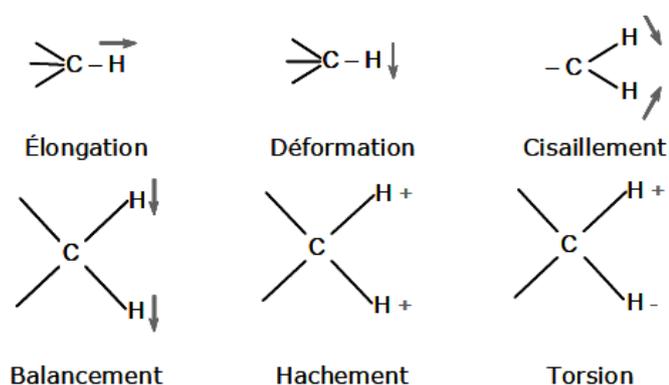


Figure 33. Mode de vibration moléculaire [Wilmet, 2000].

Cette méthode d'analyse est simple à mettre en œuvre et non destructrice. Elle permet d'analyser aussi bien les matériaux organiques que les matériaux inorganiques par la mise en évidence des groupements fonctionnels des molécules étudiées [Tab.17]. Les spectres d'absorption infrarouges sont une véritable carte d'identité de la molécule, la région comprise entre $1500-400\text{ cm}^{-1}$, est particulièrement riche en information et elle est appelée empreinte digitale de la molécule. Ainsi, à un spectre donné correspond une structure possible [Jeffrey *et al.*, 1989 ; Smith et Webb, 2007].

Tableau 17. Table de corrélation simplifiée en Infra Rouge [Pavia *et al.*, 2009].

	Groupements fonctionnels et Type de vibration	Fréquences (cm ⁻¹)	Intensité
C-H	Alcanes (élongation)	3000-2850	forte
	-CH ₃ (déformation)	1450 et 1375	moyenne
	-CH ₂ - (déformation)	1465	moyenne
	Alcènes (élongation)	3100-3000	moyenne
	(déformation hors plan)	1000-650	forte
	Aromatique (élongation)	3150-3050	forte
	(déformation hors plan)	900-690	forte
	Alcyne (élongation)	~3300	forte
	Aldéhyde	2900-2800	faible
		2800-2700	faible
C-C	Alcanes interpretation non utile		
C=C	Alcènes	1680-1600	moyenne-faible
	Aromatique	1600 et 1475	moyenne-faible
C≡C	Alcynes	2250-2100	moyenne-faible
C=O	Aldéhyde	1740-1720	forte
	Cétone	1725-1705	forte
	Acide Carboxylique	1725-1700	forte
	Ester	1750-1730	forte
	Amide	1670-1640	forte
	Anhydride	1810 and 1760	forte
	Acide Chloridrique	1800	forte
C-O	Alcools, Ethers, Esters, Acide Carboxylique, Acids, Anhydrides	1300-1000	forte
O-H	Alcools, Phénols		
	Libre	3650-3600	moyenne
	H-bonded	3500-3200	moyenne
	Acide carboxylique	3400-2400	moyenne
N-H	Amines et Amides primaires et secondaires		
	(élongation)	3500-3100	moyenne
	(déformation)	1640-1550	Moyenne-faible
C-N	Amines	1350-1000	Moyenne-faible
C=N	Imines and Oximes	1690-1640	Faible-forte
C≡N	Nitriles	2260-2240	moyenne
X=C=Y	Allènes, cetènes, Isocyanates, Isothiocyanates	2270-1950	moyenne-forte
N=O	Nitro (R-NO ₂)	1550 and 1350	forte
S-H	Mercaptans	2550	faible
S=O	Sulfoxides	1050	forte
	Sulfones, chlorure Sulfonique, Sulfates, Sulfonamides	1375-1300 et 1200-1140	forte
C-X	Fluoride	1400-1000	forte
	Chloride	800-600	forte
	Bromide, Iodide	<667	forte

II. Résultats :

Ayant mis en évidence la production de métabolites antimicrobienne chez certains *Streptomyces* isolés, un essai de caractérisation partielle de ces biomolécules à été réalisé par l'intermédiaire de d'étude spectrale en UV-Visible et Infra-rouge.

1. Extraction et purification :

L'extraction des métabolites bioactifs a été effectué à partir de surnagent de culture de WLO-001, SLN-041 et SLO-105 cultivées sur milieu ISP₂ liquide et incubées à 30°C pendant 7 jours. L'extraction à été réalisé à l'aide d'un volume égale d'acétate d'éthyle. Le solvant à été évaporé à sec et chaque extrait à été récupéré et concentré dans 1ml de méthanol. On note qu'après évaporation, les résidus obtenus avec WLO-001 et SLO-105 consistent en une substance visqueuse de couleur jaune tandis que celle obtenue avec SLN-041 se présentent sous forme de résidu sec et blanchâtre.

La purification et le fractionnement des extraits méthanolique à été réalisée sur chromatographie sur couche mince, le système de solvant employé est l'acétate d'éthyle-méthanol. Les résultats révèlent que les extraits des surnagent de culture obtenus de WLO-001 et SLO-105 présentent deux bandes de coloration jaune visible à l'œil nu. L'extrait de SLN-041, révèle une seule bande invisible à l'œil nu mise en évidence par fluorescence sous UV et qui apparait sous forme de tâche sombre. Les différentes fractions présentent des Rf compris entre 0.42 et 0.55 [Tab.18], chaque fraction a été récupérée seule pour l'étude spectrophotométrique.

Tableau 18. Rapport frontal des différentes fractions observées en CCM des filtrats de culture des *Streptomyces* isolées.

Extraits méthanolique	<i>Streptomyces</i> WLO-001	<i>Streptomyces</i> SLN-041	<i>Streptomyces</i> SLO-105
Rapport frontal	Fraction 1 : Rf : 0.42 Fraction 2 : Rf : 0.48	Fraction Rf : 0.46	Fraction 1 : Rf : 0.43 Fraction 2 : Rf : 0.53

2. Spectrophotométrie :

Seules les fractions 1 de *Streptomyces* WLO-001 (Rf : 0.42) et SLO-105 (Rf : 0.43) ainsi que la fraction de *Streptomyces* SLN-041 (Rf : 0.46) ont fait l'objet d'étude spectrophotométriques en UV-Visible et Infrarouge. Les fractions 2 de WLO-001 et SLO-105 feront l'objet d'études ultérieures. Une dénomination à été attribuée à chaque fraction :

Fraction 1 de *Streptomyces* WLO-001 : FW-001 ;

Fraction de *Streptomyces* SLN-041 : FSL-041

Fraction 1 de *Streptomyces* SLO-105 : FSO-105

2.1. Spectrophotométrie en UV-Visible :

Les spectres UV-Vis des différentes fractions sont représentés dans la figure 34. On observe que FW-001 présente un pic d'absorption en UV-Vis avec un maximum compris entre 441 et 442 nm, le maximum d'absorbance de FSL-041 est observé à 275 nm tandis que FSO-105 extraite de *Streptomyces* SLO-105, dont le spectre FSL-041 microbienne est très proche de *Streptomyces* WLO-001, présente également un spectre d'absorption similaire avec un maximum d'absorption enregistrée à 450 nm.

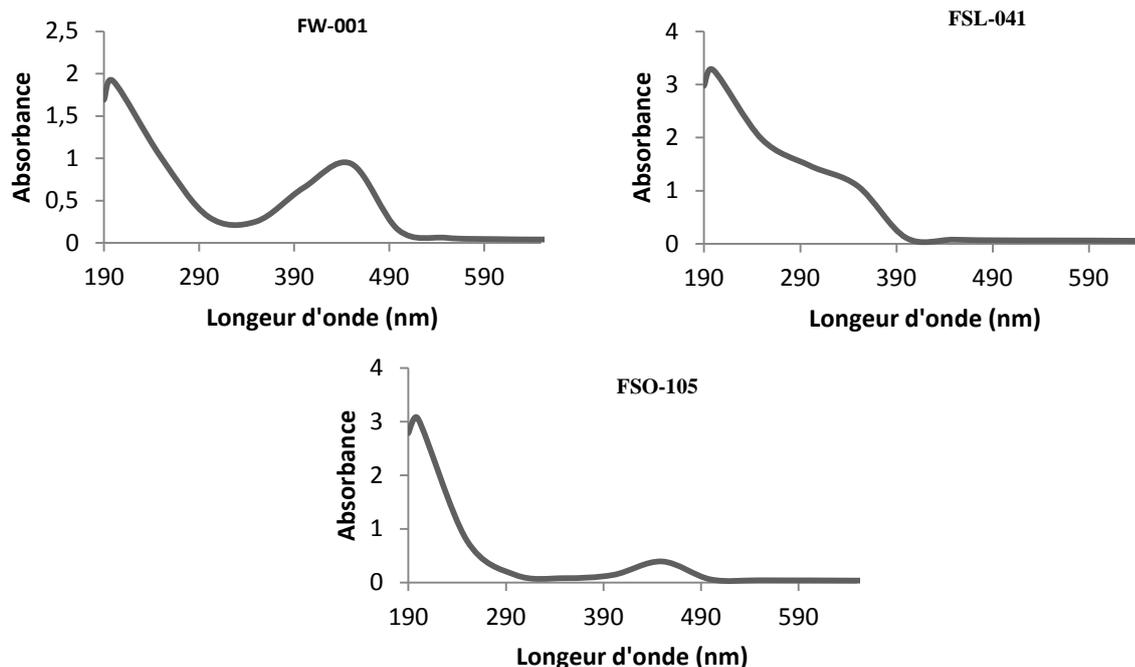


Figure 34. Spectre d'absorption des fractions méthanoliques extraites des *Streptomyces* Isolées

1.1. Spectrophotométrie Infrarouge :

Les spectres d'absorption des différentes fractions étudiées sont représentés dans la figure 35.

Les vibrations enregistrées par ces différentes fractions en FTIR sont représentées dans le tableau 19.

Tableau 19. Fréquences vibrationnelles (cm-1) observées chez les différentes fractions étudiées.

Fraction	Fréquences cm-1	Groupe fonctionnels et type de vibration
FW-001	3342.41	O-H (alcools, phénol)
	2974.03 ; 2927.74 ; 2887.24	C-H (méthylène, méthine)
	1448.44	C=C aromatique
	1380.94	N-O (aliphatique) ou C-H (méthyle)
	1089.71 ; 1049.20	C-O (alcool primaire)
	881.41	C-H aromatique (meta-disub.benzène)
FSL-041	3595.07 ; 3365.55 ; 3357.84; 3336.62	O-H (alcools, phénol)
	2974.03	C-H (méthylène)
	2835.16	C-H (aldéhyde)
	1670.24	C-C acyclique (Trisub,terasub.alcène)
	1508.23; 1448.44	C=C aromatique
	1396.37; 1375.15	C-H (méthyle) ou N-O aliphatique
	1112.85; 1026.06	C-N (amine aliphatique)
771.47	C-H aromatique (méta-disub.benzène)	
FSO-105	3353.96 ; 3346.27 ; 3334.69	O-H (alcools, phenol)
	2974.03 ; 2927.74 ; 2887.24	C-H (méthylène ,méthine)
	1456.16 ; 1419.51	C=C aromatique
	1380.94	N-O (aliphatique) ou C-H (méthyle)
	1089.71 ; 1049.20	C-O (alcool primaire)
	881.41	C-H aromatique (méta-disub.benzène)

D'après les spectres obtenus en IR on remarque une similitude dans les groupements fonctionnels des différentes fractions étudiés. On note la présence de pics caractéristiques des groupements hydroxyle (O-H) alcoolique ou phénolique chez les trois fractions analysée de même que la présence de groupements aromatique type C=C mais également C-H caractéristique des cycles benzénique (hydrocarbures aromatiques cycliques) de type méta-di.sub. On observe également la présence de groupements méthyle (CH) ou aliphatiques (NO) chez les différentes fractions.

La fraction FSL-041, présente en plus des groupements déjà cité, des liaisons C-C acyclique caractéristique des alcènes (type Tris.tetra.sub) ainsi que des groupements C-H d'aldéhyde et C-N d'amine aliphatique.

Il est à noter qu'en raison de la pigmentation des fractions FW-001 et FSO-105, de l'alcool a été utilisé pour l'humidification des composées avant passage en infra rouge, ce qui s'est traduit par la présence de pics caractéristiques d'alcool primaire en positions 1089.71 et 1049.20. Ces derniers ne doivent pas être pris en considération dans la structure recherchée de ces molécules.

II. Discussion :

L'extraction et le fractionnement en chromatographie sur couche mince des molécules bioactives bio synthétisées par *Streptomyces* WLO-001, SLN-041 et SLO-105 a permis de mettre en évidence les différentes fractions composant les métabolites actifs synthétisés. SLN-041 n'a révélée la présence que d'une seule fraction incolore caractérisée par un Rf de 0.46, tandis que *Streptomyces* WLO-001 et SLO-105 ont présentés deux fractions de couleur jaune qui indique la présence d'un mélange d'au moins deux composés différents dans leur extrait méthanolique. Les Rf correspondant à chaque fraction sont caractéristique d'une substance dans des conditions expérimentales données.

Le spectre d'absorption UV-Visible de la fraction méthanolique FLS-041 extraite de *Streptomyces* SLN-041 révèle un pic d'absorption en UV à une longueur d'onde de 275 nm ce qui suggère la présence de chromophores ou de système conjuguée tel que les aldéhyde insaturés, cétones mais également de composés cyclique aromatique [Sharman *et al.*, 1996 ; Zitouni *et al.*, 2005]. Les fractions F-001 et F-105 extraites respectivement de *Streptomyces* WLO-001 et SLO-105 ne démontrent aucune absorption dans l'UV mais un pic d'absorption dans le visible entre 441 et 442 nm pour F-001 et 450 nm pour F-150 qui désigne l'éventuelle présence de chromophores fortement conjuguées ayant entraîné un effet bathochrome [Jeffrey *et al.*, 1989].

Les spectres infrarouges ont permis de confirmer les résultats de l'analyse en UV-Visible, en effet le spectre IR de F-041 a mis en évidence la présence de groupement aldéhyde mais également la présence de composés aromatique dans la structure chimique de la molécule. La présence de ces composés aromatiques a également été mise en évidence chez F-001 et F-105 sous forme de benzéniques qui sont connus pour absorber la lumière UV-Visible avec une longueur d'onde maximale comprise entre 235 et 277 [Smith et Webb, 2007].

Sachant que les extraits de *Streptomyces* WLO-001 et SLO-105 sont colorés (coloration jaune), la présence de dérivés benzoïques dans leur structure peut être rapproché à des composés telles que les benzoquinones. En effet, ces composés aromatiques fortement conjuguées absorbent la lumière UV entre 242 et 290 nm lorsqu'ils sont en transition $\pi-\pi^*$ et entre 340-440 nm lorsqu'ils sont en transition $\eta-\pi^*$. Ce déplacement de l'absorbance de l'UV vers le visible serait dû à la coloration jaune de ce type de composés et à son état de transition [Kalsi, 2004].

Les Benzoquinones sont connus pour leurs propriétés antimicrobiennes, antifongiques et antiparasitaires [Kersten, 1977]. Certains d'entre eux tel que le 2,6-diméthoxy-1,4-benzoquinone présentent également des activités antitumorales [Pethig *et al.*, 1985 ; Pardee *et al.*, 2002].

Les dérivés benzéniques peuvent entrer dans la structure de nombreux antibiotiques naturels synthétisés par des espèces du genre *Streptomyces* tels que les tétracyclines, Pénicols et ansamycines (antibiotiques

comprenant un chromophore aromatique substituée en deux positions non-adjacentes par une chaîne aliphatique [Dewick, 2009]. Parmi ces derniers, les dérivées benzéniques sont sous forme de noyau benzoquinoléique essentiellement chez des antibiotiques comme la geldanamycine [Deboer *et al.*, 1970 ; Ochel *et al.*, 2001 ; Clermont *et al.*, 2010] ou l'ansamitocine [Higashide *et al.*, 1977 ; Schulte et Neckers, 1998] qui possèdent des propriétés antibactériennes (principalement sur les Gram positif), antifongiques ou antitumorales.

Chez la fraction F-041 de *Streptomyces* SLN-041 la présence d'un noyau benzéique et des groupements hydroxyl et aldéhydes peut être rapproché à la présence de dérivés benzénique sous forme d'hydroxybenzaldehyde ou hydroxynitrobenzaldehyde (composé incolore). L'activité antibactérienne de ce composée a été mise en évidence chez certains métabolites antibiotiques tels que la Virridomycine A isolée chez *Streptomyces viridans* [Yong et Leong, 1981].

L'étude phylogénétique réalisées sur les *Streptomyces* isolées ont permis d'établir un lien d'apparenté entre *Streptomyces* SLO-105 et *Streptomyces galbus* ainsi que *Streptomyces* SLN-041 et *Streptomyces argillaceus*. Cependant, aucune des deux espèces cités ne produits d'antibiotiques renfermant un noyau benzoquinolique ou autre dérivés benzénique dans leur structure, ce qui suggère que les métabolites produit par SLN-041 et SLO-105 sont de nature différente. En ce qui concerne WLO-001, aucune données bibliographique n'a été publiée à ce jour ce qui ne permet pas la réalisation d'une étude comparative.

L'étude spectrophotométrique des extraits méthanolique en UV. Visible et infrarouge nous a permis de mettre en évidence certains groupements fonctionnels dans la structure chimique de ces métabolites actifs, mais l'élucidation de la structure complète de ces métabolites nécessite d'autres analyses complémentaires tels que la RMN et la spectrophotométrie de masse.

Conclusion et perspectives

Conclusion et perspectives

Dans ce présent travail de thèse, nous nous sommes proposés d'étudier les aspects physiologiques, taxonomiques et cinétique de croissance et de productions d'actinomycètes nouvellement isolées au niveau des eaux et sédiments du lac Oubeira ; ainsi que la mise en évidence de leur activités antimicrobiennes et la caractérisation partielle des métabolites produits.

Les recherches réalisées dans la première partie ont été orientés vers l'isolement sélectif d'actinomycètes végétant dans ce biotope particulier. L'utilisation de milieux spécifiques nous a permis d'isoler et purifier une centaine d'isolats présentant les caractéristiques macroscopique des actinomycètes, mais seules dix d'entres eux ont été retenus pour l'analyse en raisons de l'importance des travaux à réaliser.

L'étude des caractéristiques culturelles des isolats sélectionnés, sur milieux de culture solides recommandés par l'international *Streptomyces* Project, a révélée que la majorité d'entre eux présentaient des mycéliums aériens dans la série « gris » ou « jaune », produisent des pigments diffusible ou non dans le milieu et/ ou des pigments mélanoïdes. La couleur du mycélium ainsi que la production de pigments était variable en fonction du milieu ce qui nous a permis d'en déduire une corrélation avec la composition du milieu en nutriment.

La micromorphologie optique et électronique (ESEM) des différents isolats à démontrée la présence de filaments à Gram positif, ramifiés, non fragmentés et formant des spores de type lisse (Sm) regroupées dans des chaines de spores droite (RF), flexible (RA) ou en spirale (S). L'analyse des propriétés physiologiques à mis en évidence la capacité des isolats à dégrader la plupart des glucides testés, certains sont capables de croitre à différentes températures et en présence de différents concentrations en chlorure de sodium, d'hydrolyser les bases puriques (guanine, cytosine et adénine) mais sont également capables de dégrader certains composés organique complexes grâce à la production d'enzymes spécifique tel que des amylases, caséinases, gélatinases et estérases. Seuls les isolats WLO-001 et SLN-105 produisent des lécithinases mais aucun ne produits de chitinases. Les caractéristiques morphologiques et physiologiques obtenus suggéraient un rapprochement des isolats sélectionnés au genre *Streptomyces*.

Grâce à l'analyse moléculaire du gène ADN S16, nous avons pu confirmer leur appartenance au genre *Streptomyces* sur la base de l'alignement des séquences d'ADN extraites différents isolats avec les séquences enregistrées au niveau de la banque génomique Genbank. Une étude phylogénique reposant sur un alignement multiple des séquences utilisant la méthode du Neighbour-joining nous a permis d'établir les arbres phylogénétiques des différents isolats avec les espèces apparentés présentant un haut degré de

similitude. Une étude comparative entre les isolats sélectionnés et les espèces apparentées a cependant mis en évidence des différences portant sur certaines caractéristiques morphologique et physiologique.

En perspective à cette première partie, il serait intéressant de réaliser une hybridation ADN/ADN des *Streptomyces* isolés avec les espèces apparentés afin d'établir leur niveau d'apparenter, mais également d'utiliser les nouvelles techniques de Métagénomique. En effet, ces dernière permettent le screening de la diversité microbienne d'un écosystème donné à une plus grande échelle toute en évitant les inconvénients de la mise en culture (milieu défavorable, risque de mutations élevé suite au fréquent repiquage...etc.) mais également d'inclure les bactéries non cultivables (bactéries vivantes non cultivables).

Dans la deuxième partie de notre étude, nous avons évalué le spectre d'activité antimicrobienne des isolats sélectionnés vis-à-vis de microorganismes cibles de référence ATCC : *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Streptococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus* MRSA, *Micrococcus latus*, *Bacillus subtilis*, *Candida albicans*, *Rodotorrula mucilaginosa* et *Aspergillus niger*. Les résultats ont démontrés que les isolats WLO-001 et SLN-105 possédait une activité antibactérienne exclusivement à l'égard des bactéries Gram positif test ainsi qu'une activité antifongique sur *R.mucilaginosa* et *A.niger*. SLN-021 n'a présentait qu'une activité antifongique sur les deux espèces précédente et SLN-041 est actif uniquement sur les bacilles Gram négatif et positif *E.coli* et *B.subtilis*. Les six autres isolats n'ont démontrés aucune activité vis-à-vis des microorganismes cibles.

Les essais de culture submergée en mode « Fed-Batch » réalisés en erlenmeyer puis en fermentateur pour suivre les caractéristiques de la cinétique de croissance et de production de métabolites bioactifs ont permis dans un premier temps d'observer les aspects morphologiques des isolats en culture liquide. En effet, ces derniers ont présentait des formes différentes : filaments libres pour SLN-021 et SLN-041 et agrégats de couleur jaune pour WLO-001 et SLO-105. Le suivi des cinétiques de croissance des isolats en milieu liquide a montré une croissance rapide durant les 24-72h de culture accompagnée d'un abaissement du pH et une consommation en oxygène marquant la phase exponentielle de croissance. Cette phase et précédé une phase de ralentissement de croissance et le début de la production de métabolites antimicrobiens ; les concentrations les plus élevés sont atteintes en fin phase stationnaire de culture. En culture liquide aucune activité antifongique n'a cependant été détectée dans les filtrats de cultures des isolats.

L'étude de l'influence des sources de carbone et d'azote sur la croissance et la production de métabolites bioactif par les différents isolats ont mis en évidence une préférence pour les sucres simple (Hexoses) tel que le fructose et le mannitol alors que les di et polysaccharides semblent moins favorable. La proline (acide aminé aromatique) stimule favorablement la croissance et la production chez WLO-001 et SLO-105 ; pour SLN-041 c'est la méthionine et l'acide glutamique qui constituent les sources d'azotes les plus

favorables. Les sources d'azote minérales donnent également une biomasse conséquente et production des molécules antibactériennes.

En complément à cette partie du travail, il conviendrait d'exploiter les résultats obtenus sur le profil de croissance des isolats et leur rapport avec les sources de carbone et d'azote pour mettre au point un milieu plus rentable aussi bien pour la production de métabolites bioactifs que pour l'obtention d'une bonne biomasse. Les paramètres de cultures, notamment l'aération et l'agitation, doivent également être optimisés afin de lever le stress pour la production des métabolites antifongiques ?! et penser à étudier la cinétique en fermentation continue pour certains isolats.

Dans la troisième partie de cette thèse, nous avons procédé à l'extraction des filtrats de culture de WLO-001, SLN-041 et SLO-105 par l'acétate d'éthyle. Les extraits secs obtenus ont été soumis à un fractionnement et une purification par chromatographie sur couche mince qui a révélé que les extraits de WLO-001 et SLO-105 présentait deux fractions correspondant probablement à la présence d'un mélange d'au moins deux composés. Le filtrat de culture de SLN-041 ne présente qu'une seule fraction après migration en CCM. L'application de techniques de spectrophotométrie UV-Visible et Fourier Transformé Infrarouge (FTIR) des molécules produites afin d'en établir une caractérisation chimique partielle a été réalisée sur trois fractions F-001, F-041 et F-105 extraites respectivement de *Streptomyces* WLO-001, SLN-041 et SLO-105. Les résultats révèlent la présence de différents groupements fonctionnels dont un noyau aromatique benzénique au niveau de structure chimique des trois molécules étudiés. Les pics d'absorption en UV-Visible des fractions F-001 et F-105 ainsi que leur couleur jaune nous ont orientés vers la probabilité d'une présence de dérivés benzéniques sous forme de benzoquinone, composé de couleur jaune doté d'une activité antibactérienne et antifongique. Ceci concorde avec le spectre d'activité antimicrobienne de *Streptomyces* WLO-001 et SLO-105. La fraction F-041, incolore, présentant quant à elle des groupements fonctionnels hydroxyle, aldéhyde et un noyau aromatique benzénique nous laisse supposer la présence d'hydroxybenzaldéhyde ou de dérivés voisins dans la structure de la molécule produite. Ce type de dérivés benzéniques sont connus pour posséder des propriétés antibactériennes qui se manifeste aussi bien à l'égard des bactéries Gram positif et Gram négatif. Cependant, aucune des espèces apparentées génétiquement à WLO-001, SLN-041 et SLO-105 n'est connue pour produire de métabolites antimicrobiens de type aromatique.

La caractérisation de la structure complète des molécules produites reste cependant à établir en utilisant des techniques complémentaires notamment la spectrophotométrie de masse et de résonance magnétique nucléaire.

Notre étude qui constitue un thème original, entre dans le cadre de l'exploration et la valorisation de la biodiversité actinomycéticque d'une zone humide d'importance internationale dans la région

méditerranéenne. Les résultats obtenus se sont révélés prometteur et nous incite à poursuivre nos efforts de recherche dans cette thématique afin de sélectionner des espèces doués d'activités biologiques intéressantes pouvant être exploités en bioindustries.

Résumés

Résumé

Au cours de ce travail de thèse, nous nous sommes intéressés à la recherche de molécules bioactives à partir d'actinomycètes isolées au niveau des eaux et sédiment du lac Oubeira. L'étude taxonomique et physiologique des isolats ainsi que l'utilisation de techniques moléculaire nous a permis d'identifier les dix isolats étudiés et de les affilier au genre *Streptomyces* ; ainsi que d'établir leur phylogénie avec les espèces apparentés présentant un degré élevé de similitude.

Le screening des activités antimicrobiennes sur milieux solide des différents isolats a démontrée la production de métabolites antibactériens et/ou antifongique par quatre d'entre eux. Les isolats WLO-001 et SLO-105 sont actif sur les bactéries Gram positif cible dont *S.aureus* MRSA, sur une levure *R.mucilaginosa* et une moisissure *A.niger*. L'isolat SLN-021 produit un antifongique également actif sur ces deux espèces et l'isolat SLN-041 synthétise un antibiotique actif à l'encontre de *B.subtilis* et *E.coli*.

Les cinétiques de croissance et de production réalisée en milieu liquide en erlen puis en fermenteur en mode « Fed-batch », nous ont renseignés sur les paramètres de croissance des isolats. On observe une croissance découplée, caractérisée par une première phase de croissance rapide suivi d'une phase de production des métabolites antibactériens. Cette dernière débute en fin de phase exponentielle de croissance pour se poursuivre jusqu'en fin de phase stationnaire. Les cultures liquides ont également mis en évidence un possible effet de « stress » métabolique exercé par une inhibition de la synthèse de molécules antifongiques.

L'évaluation de l'effet exercé par différentes source de carbone et d'azote sur le métabolisme des isolats sélectionnés et leur rapport avec l'utilisation de différentes sources de carbone et d'azote a montré que préférence pour les sucres simples (fructose et mannitol) ainsi qu'un effet stimulant en présence de certains acides aminés tel que la proline, la méthionine et l'acide glutamique.

L'extraction des filtrats de culture de WLO-001, SLN-041 et SLO-105 a permis d'obtenir des extraits secs. Leur purification et fractionnement sur Chromatographie sur couche mince a mis en évidence la présence de deux fractions différentes dans les filtrats de culture de WLO-001 et SLO-105. L'application de techniques spectrophotométriques sur les trois fractions étudiées a permis de détecter la présence de dérivés benzénique dans leur structure chimique qui les rapproche aux antibiotiques de type aromatique.

Mots clés : *Streptomyces*, taxonomie, activités antimicrobiennes, cinétique de croissance, structure chimique.

Abstract

In this thesis, we are interested in finding bioactive molecules isolated from actinomycetes species collected in water and sediment of Lake Oubeira. The taxonomic and physiological study of the isolates and the use of molecular techniques allowed us to identify the ten isolates tested and to affiliate to the genus *Streptomyces*, as well as to establish their phylogeny with the related species with a high degree of similarity.

Screening of antimicrobial activities on solid media of the different isolates demonstrated the production of antibacterial metabolites and / or antifungal activity by four of them. Isolates WLO-001 and SLO-105 are active against Gram-positive target including *S.aureus* MRSA, yeast *R.mucilaginosa* and mold *A.niger*. The isolate SLN-021 also produced an antifungal active on these two species and SLN-041 isolate synthesizes an antibiotic active against *E. coli* and *B. subtilis*.

The growth kinetics and production conducted in liquid medium in Erlenmeyer flask and in fermentor in fed-batch, have shown on the growth parameters of the isolates. There is a growth-coupled, characterized by an initial phase of rapid growth followed by a stage production of antibacterial metabolites. The production phase began in the late exponential growth phase and continued until late stationary phase. Liquid cultures have also revealed a possible effect of 'stress' exerted by metabolic inhibition of the synthesis of antifungal compounds.

The evaluation of the effect exerted by different source of carbon and nitrogen metabolism of selected isolates and their relationship to the use of different sources of carbon and nitrogen showed that preference for simple sugars (fructose and mannitol) and a stimulatory effect in the presence of some amino acids such as proline, methionine and glutamic acid.

Extraction of culture filtrates of WLO-001, SLN-041 and SLO-105 yielded solids. Purification and fractionation on TLC revealed the presence of two different fractions in the culture filtrates of WLO-001 and SLO-105. Applications of spectrophotometric techniques on the three fractions studied have detected the presence of benzene derivatives in their chemical structure that brings them closer to aromatic antibiotics.

Key words: *Streptomyces*, taxonomic, antimicrobial activities, growth kinetic, chemical structure.

Références bibliographiques

Accoceberry I et Noël T, 2006. Antifongiques : cibles cellulaires et mécanismes de résistance. *Thérapie*. Vol 61 (3): 195-199.

Aharonowitz Y and Demain A.L, 1979. Nitrogen nutrition and regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol*. Vol 25 : 61-67.

Ahmad K and Bhuiyan J.A.M, 1958. A new antifungal *Streptomyces* species, *Streptomyces corchorussi*. *Pakistan J Biol Agr Sci*. Vol 1 (2): 137-143.

Anderson L.E., Ehrlich J., Sun S.H and Burkholder P.R, 1956. Strains of *Streptomyces*, the sources of azaserine, elaiomycin, griseoviridin and viridogrisein. *Antibiot Chemother*. Vol 6 (2) : 100-115.

Atalan E., Manfio G.P., Ward A.C., Kroppenstedt R.M and Goodfellow M. 2000. Biosystematic studies on novel streptomycetes from soil. *Antonie Van Leeuwenhoek*. Vol 77 (4) : 337-53.

Augustine S.K., Bhavsar S.P and Kapadnis B.P, 2005. Production of a growth dependent metabolite active against dermatophytes by *Streptomyces rochei* AK35 *Indian J. Med. Res.*, 121: 146-170.

B

Ball A.S., Betts W.B and Mc Carthy A.J, 1989. Degradation of Lignin-Related Compounds by Actinomycetes. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol 55 (6) : 1642-1644.

Brana A.F., Wolf S. and Demain A.L, 1985. Ammonium repression of cephalosporin production by *Streptomyces clavuligerus*. *Can J Microbiol*. Vol 31: 736-743.

Ben Ameer Mehdi R, Sioud S, Fourati Ben Fguira L, Bejar S, Mellouli L. 2006. Purification and structure determination of four bioactive molecules from a newly isolated *Streptomyces* spp. TN97 strain. *J Process Biochemistry*. Vol 41 (15): 06-13.

Benachour A., Morin T., Henert L., Budin-Verneuil A., Le Jeune A., Auffray Y and Pichereau V, 2009. Identification of secreted and surface proteins from *Enterococcus faecalis*. *Canadian Journal of Microbiology*. Vol. 55(8): 967-974.

Berdy J, 2005. Bioactive microbial metabolites. *J. Antibiot*. Vol 58 : 1-26.

Berdy J., Aszalos A and Mc Nitt K.L, 1987. *CRC Handbook of Antibiotic Compounds*, vol. XIII. *Microbial Metabolites*, Parts 1-3. CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Bergogne-Bérézin E et Dellamonica P, 1999. *Antibiothérapie en pratique Clinique*. 2ème ed. Masson.

Betina V, 1973. Bioautography in paper and thin layer chromatography and its scope in the antibiotic field. *J. chromatogr*. Vol 78: 41-51.

Boumezbeur A et Ameer N, 2002. Réserve intégrale du lac Oubeira. *Direction générale des forêts*.

Bull A.T and Stach J.E.M, 2007. Marine actinobacteria: new opportunities for natural product search and discovery. *TRENDS Microbiol*. Vol 15: 491-499.

Bu'Lock J.D, 1975. Secondary metabolite in fungi and its relationship to growth and development. In: The Filamentous Fungi. (Smith, J.E. and Berry, R.D. Eds). Wiley and Soc. Inc. Vol 1 : 35-3 8:

Bycroft B.W, 1988. Dictionary of Antibiotics and Related Substances. Chapman and Hall. London.

Byrne K.M and Greenstein M, 1986. Nitrogen repression of gilvocarcin V production in *Streptomyces arenae* 2064. J Antibiot. Vol 39 : 594-600.

C

Cabot G., Ocampo-Sosa A.A., Tubau F., Macia M.D., Rodriguez C., Moya B., Zamorano L., Suarez C., Pena C., Martinez-Martinez L., Oliver A., and the Spanish Network for Research in Infectious Diseases (REIPI), 2011. Overexpression of AmpC and Efflux Pumps in *Pseudomonas aeruginosa* Isolates from Bloodstream Infections: Prevalence and Impact on Resistance in a Spanish Multicenter Study. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 55 (5) : 1906–1911.

Caffrey P., Lynch S., Flood E., Finnan S., Oliynyk M, 2001. Amphotericin biosynthesis in *Streptomyces nodosus*: deductions from analysis of polyketide synthase and late genes. Chem Biol. Vol 8(7):713-23.

Castro J.M., Liras P., Cortes J. and Martin J.F, 1985. Regulation of a-aminoacylcysteinyI-valine, isopenicillin N synthetase, isopenicillin N isomerase and deacetoxycephalosporin C synthetase by nitrogen sources in *Streptomyces lactamdurans*. Appl Microbiol Biotechnol. Vol 22 : 32-40.

Carreras C., Frykman S., Ou S., Cadapan L., Zavala S., Woo E., Leaf T., Carney J., Burlingame M., Patel S., Ashley G and Licari P,2002. Saccharopolyspora erythraea-catalyzed bioconversion of 6-deoxyerythronolide B analogs for production of novel erythromycins. J. Biotechnol. Vol 92 : 217-228

Chabasse D., Pihet M et Bouchara J.P, 2009. Émergence de nouveaux champignons pathogènes en médecine : revue générale. Mycologie. Vol 416 : 71-86.

Chambers H.F, 2001. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? Emerg. Infect. Dis. Vol 7 : 178–1.

Chang C.L., Xu L.H, 1996. Diversity of aquatic Actinomycetes in lakes of the middle plateau, Yunnan, China. Appl Environ Microbiol. Vol 62 (1): 249-253.

Chatterjee S., Vining L.C., Westlake D.W.S, 1983. Nutritional requirements for chloramphenicol biosynthesis in *Streptomyces venezuelae*. Revue canadienne de microbiologie. Vol 29 : 247-253

Chen C.W., Huang C.H., Lee H.H., Tsai H.H., and Kirby R, 2002. Once the circle has been broken: dynamics and evolution of *Streptomyces* chromosomes. Trends Genet 18: 522-529.

Choi D., Park E. and Okabe M, 2000. Dependence of apparent viscosity on mycelial morphology of *Streptomyces fradiae* culture in various nitrogen sources. Biotechnology Progress. Vol 16 : 525-532.

Chun J., Youn H.D., Yim Y.I., Lee H., Kim M.Y., Hah Y.C and Kang S.O, 1997. *Streptomyces Seoulensis* sp. Nov. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol 47 : 492-498.

Clermont N., Legault G., Lerat S and Carole Beaulieu C, 2010. Effect of biopolymers on geldanamycin production and biocontrol ability of *Streptomyces melanosporofaciens* strain EF-76. Canadian Journal of Plant Pathology. Vol 32 (4) : 481 - 489

Collins M.D., Goodfellow M., Minnikin D.E, Alderson G, 1985. Menaquinone composition of mycolic acid containing actinomycetes and some sporoactinomycetes. Journal of applied bacteriology. Vol 58 (1) : 77-86

Cooper R., Das P., Federbush C., Mierzwa R., Patel M., Pramanik B and Trumes I, 1990. Characterization of peptidyl-nucleoside antifungal antibiotics from fermentation broth. J. Ind. Microbiol. Vol 5: 1-8.

Cross T, 1989. Growth and Examination of *Actinomycetes* Some Guidelines. In Bergey's Manual of Systematic bacteriology. 4th. Williams and Wilkins Company, Baltimore: 2340-2343.

Cortes J., Haydock S.F., Roberts G.A., Bevitt D.J., and Leadlay P.F, 1990. An unusually large multifunctional polypeptide in the erythromycin-producing polyketide synthase of *Saccharopolyspora erythraea*. Nature. Vol 348 : 176-178

D

Dahiya N., Tewari R and Hoondal G.S, 2006. Biotechnological aspects of chitinolytic enzymes. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 71: 773-782.

Da Silva M.C., Bertolini M.C and Ernandes J.R, 2001. Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. J. Basic Microbiol. , 41, 269-280.

Davies T, 1998. The history of near infrared spectroscopic analysis : past, present and future : From sleeping technique to the morning star of spectroscopy ». Analysis Magazine. Vol 26 : 7-12

Davies F.L and Williams S.T, 1970. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. Soil Biol. Biochem. Vol 2: 239-246.

Deboer C., Meulman P.A., Wnuk R. J and Peterson D. H, 1970. Geldanamycin a new antibiotic. J. Antibiot. Vol 23 : 442.

Del Papa M.F and Perego M, 2011. *Enterococcus faecalis* Virulence Regulator FsrA Binding to Target Promoters. Journal of Bacteriology. Vol 193(7) : 1527–1532.

Dekleva M.L., Jeffrey A. Titus J.A and Strohl W.R, 1985. Nutrient effects on anthracycline production by *Streptomyces peucetius* in a defined medium. Canadian Journal of Microbiology. Vol. 31 (3) : 287-294.

Demain A.L, 2000. Pharmaceutically active secondary metabolites of microorganisms. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 52 :455-63

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

Demain A.L. and Piret J.M, 1991. Cephamycin production by *Streptomyces clavuligerus*. In: Genetics and production formation in *Streptomyces* (eds. S. Baumberg, H. Krügel and D. Noack). Proceedings of FEMS Symposium. Vol 55 : 87-103.

Demain A.L, 1974. Biochemistry of penicillin and cephalosporin fermentation. *Lloydia*. Vol 37 : 147-167.

Dietz, A, 1988. Practical and proposed cooperative investigational criteria for taxonomic studies of the Actinomycetales. In: *Biology of Actinomycetes*. Okami Y., Beppu T and Ogawara H (eds.), Tokyo: Japan Sci. Soc. Press: 203-209.

Dewick P.M, 2009. Medicinal natural product. A biosynthetic approach. 3th Ed. John Wiley and Sons Ltd.

Doull J.I and Vining L.e, 1990. Nutritional control of actinotherdin production by *Streptomyces coelicolor* A3(2): suppressive effects of nitrogen and phosphate. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol 32 : 449-454.

Drew S.X and Demain A.L, 1977. Effect of primary metabolites on secondary metabolism. *Annu Rev Microbiol*. Vol 31 : 343-356.

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

Dyson P and Schrempf H, 1987. Genetic instability and DNA amplification in *streptomycetes lividans*. *J. Bacteriol*. Vol 169 : 4796-4803.

E

Efremenkova O.V., Anisova L.N and Khokhlov A.S, 1977. Induced variability of *Streptomyces galbus*. *Antibiotiki*. Vol 22(10) :915-919.

El Blidi S., Fekhaoui M., Serghini A et El Abidi A, 2006. Rizières de la plaine du Gharb (Maroc). Qualité des eaux superficielles et profondes. *Bull. Inst. Sci., Rabat, section Sci. Vie*. Vol 28 : 55-60.

Eliopoulos G.M, 2005. Antimicrobial agents for treatment of serious infections caused by resistant *Staphylococcus aureus* and enterococci. *European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Vol 24(12): 826-831.

El-Tarabily K.A., Solimana M.H., Nassara A.H., Al-Hassania H.A., Sivasithamparam K., McKennad F and Hardy G.E, 2000. Biological control of *Sclerotinia minor* using a chitinolytic bacterium and actinomycetes. *Plant Pathol*. Vol 49: 573-583.

El-Tarabily K.A, 2006. Rhizosphere-competent isolates of streptomycetes and non-streptomycetes actinomycetes capable of producing cell-wall-degrading enzymes to control *Pythium aphanidermatum* damping-off disease of Cucumber. *Can. J. Bot*. Vol 84: 211-222.

Ensign J.C., Normand P., Burden J.P and Yallop C.A, 1993. Physiology of some actinomycete genera. *Res.Microbiol*. Vol 144 : 659-660.

F

Felsenstein J, 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution*. Vol 39: 783-791.

Fernandez L., Breidenstein E.B.M., Hancock R.E.W, 2011. Creeping baselines and adaptive resistance to antibiotics. *Drug Resistance Updates*. Vol 14 : 1-21.

Findlow S.C., Winsor C., Simpson T.J., Crosby J and Crump M.P, 2003. Solution structure and dynamics of oxytetracycline polyketide synthase acyl carrier protein from *Streptomyces rimosus*. *Biochemistry*. Vol 42 : 8423-8433

Fjærviik E and Zotchev S.B, 2005. Biosynthesis of the polyene macrolide antibiotic nystatin in *Streptomyces noursei*. *Appl Microbiol Biotechnol*. Vol 67 (4): 436-443.

Frommer W, 1959. The systematic of Actinomycin forming *Streptomyces*. *Arch Mikrobiol*. Vol 32 : 187-206.

G

Garrity G.M., Bell J.A and Lilburn T.G. 2004. Taxonomic Outline of Prokaryotes. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*.

Gharaibeh R., Saadoun I and Mahasneh A, 2003. Evaluation of combined 16S rDNA and strb1 gene targeted PCR to identify and detect streptomycin-producing *Streptomyces*. *J. Basic. Microbiol*. Vol 43: 301-311.

Gohel V., Singh A., Vimal M., Ashwini P and Chatpar H.S, 2006. Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *Afr. J. Biotechnol*. Vol 5: 54-72.

Goldman G.H., da Silva Ferreira M.E., dos Reis Marques E., Savoldi M., Perlin D., Park S., Godoy Martinez P.C., Goldman M.H. and Colombo A.L, 2004. Evaluation of fluconazole resistance mechanisms in *Candida albicans* clinical isolates from HIV-infected patients in Brazil. *Diagn Microbiol Infect Dis*. Vol 50 : 25-32.

Gonzalez R., Islas L., Obrego, A.M., Escalante L and Sanchez S, 1995. Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea* : stimulatory effect of ammonium. *J. Antibiot*. Vol 48 : 715-719.

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

Goodfellow M., Williams S.T and Mordarski M, 1988. *Actinomycetes in Biotechnology*. Londres.

Goodfellow M., Cross T, 1984. Classification. In: *Biology of the actinomycetes*. Goodfellow M., Mordarski M and Williams S.T (eds.), London: Acad. Press : 7-164.

Goodfellow M and Williams S.T, 1983. Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*. Vol 37 : 189-216.

Goodfellow M, 1971. Numerical taxonomy of some nocardioform bacteria. *J. Gen. Microbiol*. Vol 69 : 33-90.

Gordon R.E and Barnett D.A, 1977. Resistance to rifampicin and lysozyme of strains of some species of *Mycobacterium* and *Nocardia* as a taxonomic tool. *Int. J. Syst. Bacteriol*. Vol 27: 176–178.

Gordon R.E., Barnett D.A., Handehan J.E and Pang C.H, 1974. *Nocardia coeliaca*, *Nocardia autotrophica* and *Nocardia* Strain. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol 24: 54-63.

Gupta A.K, 2001. Systemic antifungal agents. In: Wolverton SE, ed. Comprehensive Dermatologic Drug Therapy : 55-84.

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

H

Higashide E., Asai M., Ootsu K., Tanida S., Kozai Y., Hasegawa T., Kishi T., Sugino Y and Yoneda, 1977. Ansamitocin, a group of novel maytansinoid antibiotics with antitumour properties from *Nocardia*. M. Nature. Vol 270 : 721.

Hodgson D.A, 2000. Primary metabolism and its control in Streptomycetes: a most unusual group of bacteria. Adv. Microb. Phys. Vol 42 : 47-238.

Hana Y., Chun J, 2004. *Nocardioides aestuarii* sp. Nov., isolated from tidal flat sediment. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology. Vol 54: 2151-2154.

Hankin L., Zucker M and Sands M, 1971. Improved solid medium for the detection and enumeration of pectolytic bacteria. Appl. Microbiol. Vol 22 : 205-209.

Hassan M.A., El-Naggar M.Y., Said W.Y, 2001. Physiological factors affecting the production of an antimicrobial substance by *Streptomyces violatus* in batch cultures. Egypt. J. Biol. Vol 3: 1-10.

Hay R.J, 2003. Antifungal drugs used for systemic mycoses. Dermatol.Clin. Vol 21: 577-587.

Holt J.J., Sharp E and Williams S.T, 1994. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams and Williams, Baltimore, London.

Hopwood D.A., Bibb M.J., Chater K.F., Kieser T., Bruton C.J., Kieser H.M., Lydiate D.J., Smith C.P., Ward J.M and Schrempf H, 1985. Genetic Manipulation of *Streptomyces*: A Laboratory Manual. John Innes Foundation, Norwich, United Kingdom.

Hsu S.C and Lockwood J.L. 1975. Powdered Chitin Agar as a Selective Medium for Enumeration of Actinomycetes in Water and Soil. Appl. Microbiol. Vol 29: 422-426.

Hu H.B., Lackovich J.K and Lee J.E, 2002. High specificity and robustness of AccuPrime™ *Taq* provides the ideal tool for demanding miniaturized, multiplex, and high-throughput PCR. Focus. Vol 24(2): 11-13.

Hu ZY., Liou SZ., Huang YJ and Su WJ, 2000. A rapid screening assay for insecticidal antibiotic produced by marine actinomycetes. Mar. Sci. Bull. Vol 19: 36-41.

J

Jacobsen F., Fisahn C., Sorkin M., Thiele I., Hirsch T., Stricker I., Klaassen T., Roemer A., Fugmann B and Steinstraesser L, 2011. Efficacy of Topically Delivered Moxifloxacin against Wound Infection by

Pseudomonas aeruginosa and Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. Vol 55 (5) : 2325–2334.

Janin J, 1985. Méthodes biophysiques pour l'étude des biomolécules. Ed. Hermann, Paris.

Jeffery G.H., Basset J., Mendham J and Denny R.C, 1991. VOGEL's Textbook of Quantitative Chemical Analysis. 5 Ed., Longman.

Jensen P.R, Mincer T.J, Williams P.G and Fenical W, 2005. Marine actinomycete diversity and natural product discovery. Antonie van Leeuwenhoek. Vol 87: 43-48.

Jensen P.R., Dwight R and Fenical W, 1991. Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. Appl. Environ. Microbiol. Vol 57: 1102-1108.

Jones G.H and Hopwood D.A, 1984. Molecular cloning and expression of the phenoxazinone synthase gene from *Streptomyces antibioticus*. J. Biol. Chem. Vol 259 : 14151-14157

K

Kamat U.S., Fereirra A., Amonkar D., Motghare D.D., Kulkarni M.S.2009. Epidemiology of hospital acquired urinary tract infections in a medical college hospital in Goa. Indian J Urol. 25(1): 76-80.

Kenneth L.K, 1958. Prepared research paper RP 2911, Central Notations for the Revised ISCC-NBS color name blocks. J. Res.NBS. Vol 16 : 427.

Kersten W, 1971. Inhibition of RNA synthesis by quinine antibiotics. Prog. Mol. Subcell. Biol. 2: 48-57.

Khaoua S., Lebrihi A., Laakel M., Schneider F., Germain P and Lefebvre,G, 1992. Influence of short-chain fatty acids on the production of spiramycin by *Streptomyces ambofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 36 : 763-767.

Kieser T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F and Hopwood D.A, 2000. Practical *Streptomyces* Genetics, John Innes Foundation, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UH, England

Kim W.S., Wang Y., Fang A and Demain A.L, 2000. Methionine interference in rapamycin production involves repression of demethylrapamycin methyltransferase and Sadenosylmethionine synthetase. Antimicrob Agents Chemother. Vol 44 : 2908-2910.

Krausz P., Benhaddou R et Granet R, 2008. Mini manuel de chimie organique. Ed Dunod. Paris.

Kumar S., Tamura K., Jakobsen I.B. and Nei M, 2001. MEGA2: molecular evolutionary genetics analysis software. Bioinformatics. Vol 17: 1244-1245.

Kumar Y and Goodfellow M, 2010. Reclassification of *Streptomyces hygrosopicus* strains as *Streptomyces aldersoniae* sp. nov., *Streptomyces angustmyceticus* sp.nov., comb.nov., *Streptomyces ascomycinicus* sp.nov., *Streptomyces decoyicus* sp. nov., comb. nov., *Streptomyces milbemycinicus* sp. nov. and *Streptomyces wellingtoniae* sp. nov. International Journal of Systematic and Evolutinary Microbiology. Vol 60 : 769-775.

L

Lacaze J.C, 1998. Eutrophisation des eaux marines et continentales. Ed Broché.

Lanoot B., Vancanneyt M., Dawyndt P., Cnockaert M., Zhang J., Huang Y., Liu Z and Swings J, 2004. BOX-PCR fingerprinting as a powerful tool to reveal synonymous names in the genus *Streptomyces*. Emended descriptions are proposed for the species *Streptomyces cinereorectus*, *S. fradiae*, *S. tricolor*, *S. colombiensis*, *S. filamentosus*, *S. vinaceus* and *S. phaeopurpureus*. *Syst Appl Microbiol*. Vol 27 : 84-92.

Lautru S., Deet, R.J., Bailey L and Challis G.L, 2005. Discovery of a new peptide natural product by *Streptomyces coelicolor* genome mining. *Nat. Chem. Biol*. Vol 1 : 265-269.

Lazzarini A., Cavaletti L., Toppo G and Marinelli F, 2001. Rare genera of actinomycetes as potential sources of new antibiotics. *Anton. Van Leeuwen*. Vol 78: 399-405.

Leblond P and Decaris B, 1994. New insights into the genetic instability of *Streptomyces*. *FEMS Microbiol Let*. Vol 123: 225-232.

Lebrihi A., Lamsaif D., Lefebvre G and Germain P, 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl. Microbiol. Biotechnol*. Vol 37 : 382-387.

Lechevalier M.P and Lechevalier H.A, 1980. The chemotaxonomy of actinomycetes. *Society for Industrial Microbiology* : 29-291.

Lechevalier M.P and Lechevalier H.A, 1970. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int. J. Syst. Bacteriol*. Vol 20: 435-443.

Lee J.Y and Hwang B.K, 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol*. Vol 48: 07-417.

Lee M.S., Kojima I and Demain A.L, 1997. Effect of nitrogen source on biosynthesis of rapamycin by *Streptomyces hygroscopicus*. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*. Vol 19 (2) : 83-86.

Li L., Qiao B. and Yuan Y, 2007. Nitrogen sources affect streptolydigin production and related secondary metabolites distribution of *Streptomyces lydicus* AS 4.2501. *Chin J Ckem Ettg*. Vol 15 : 403-410.

Liao Y., Wei Z.H., Linquan Bai L., Deng Z and Zhong J.J, 2009. Effect of fermentation temperature on validamycin A production by *Streptomyces hygroscopicus* 5008. *Journal of Biotechnology*. Vol 142 (3-4) : 271-274.

Lilley G., Clark A.E and Lawrence G.C, 1981. Control of the production of cephamycin C and thienamycin by *Streptomyces cattleya* NRRL 8057. *J. Chem. Technol. Biotechnol*. Vol 31 : 127- 134.

Locci R. and Sharples G.P, 1984. Morphology. In: "The biology of Actinomycetes". Goodfellow M., Mordarski M., Williams S.T. Eds. Academic Press, London : 165-199.

Locci R, 1989. *Streptomyces* and related Genera. In: *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, Williams and Wilkins Company, Baltimore. Vol 4: 2451-2508.

Lombo P., Bran A.F., Mendez A.C and Salas J.A, 1999. The Mithramycin gene cluster of *Streptomyces argillaceus* contains a positive regulatory gene and two repeated DNA sequences that are located at both ends of the cluster. *Journal of Bacteriology*. Vol 181 (2) : 642-647.

Lounes A., Lebrihi A., Benslimane C., Lefebvre G. and Germain P, 1995. Glycerol effect on spiramycin production and valine catabolism in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr.Microbiol*. Vol 31 : 304-311 .

M

Mason M.G., Ball A.S., Reeder B.J., Silkstone G., Nicholls P and Wilson M.T, 2001. Extracellular Heme Peroxidases in Actinomycetes: a Case of Mistaken Identity. *Appl. Environ. Microbiol*. Vol. 67 (10) : 4512-4519.

Marchal N et Bourdon J.L, 1973. Milieux de culture et identification biochimique des bactéries. Ed Doin. Paris.

Martin J.F and Aharonowitz Y, 1983. Regulation of biosynthesis of β -lactam antibiotics. In: *Handbook of Experimental Pharmacology* (Eds.). Vol 67 : 229-254.

Martin J.F and Demain A.L, 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev*. Vol 44 : 230-251.

Martin P., Dary A and Decaris B, 1998. Generation of a genetic polymorphism in clonal populations of the bacterium *Streptomyces ambofaciens*: characterization of different mutator states. *Mutat Res*. Vol 421: 73-82.

Matsukawa M., Nakagawa Y., Limura Y and Hayakawa M, 2007. A New Enrichment Method for the Selective Isolation of Streptomyces from the Root Surfaces of Herbaceous Plants. *Actinomycetologica*. Vol 21: 66- 69.

McCarthy A.J and Williams S.T, 1992. Actinomycetes agents of biodegradation in the environment. *Gene*. Vol 115 : 189-192.

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

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. *Res. Microbiol*. Vol 154: 345-352.

Michael T and Christopher W, 2002. New Mechanism for Pyrrole Synthesis: Proline to Pyrrole Conversion During Undecylprodigiosin and Pyoluteorin Biosynthesis. *Chem. and Biol*. Vol 9 : 171-184.

Milcent R, 2007. *Chimie organique: Stéréochimie, entités réactives et réactions*. EDP Sciences.

Miyazaki T., Miyazaki Y., Izumikawa K., Takeya H., Miyakoshi S., Bennett J.E. and Kohno S, 2006. Fluconazole treatment is effective against a *Candida albicans* erg3/erg3 mutant in vivo despite in vitro resistance. *Antimicrob Agents Chemother*. Vol 50 : 580-586.

Morgan J., Wannemuehler K.A., Marr K.A., Hadley S., Kontoyiannis D.P., Walsh T.J., Fridkin S.K., Pappas P.G et Warnock D.W, 2005. Incidence of invasive aspergillosis following hematopoietic stem cell and solid organ transplantation: interim results of a prospective multicentre surveillance program. *Med Mycol.* Vol 43 (Suppl1) : S49-58.

Muto C.A., Jernigan J.A., Ostrowsky B.E., Richet H.M., Jarvis W.R., Boyce J.M., Farr B.M, 2003. *Infection Control and Hospital Epidemiology.* Vol. 24(5) : 362-386

N

Naeimpoor F and Mavituna F, 2000. Metabolic Flux Analysis in *Streptomyces coelicolor* under Various Nutrient Limitations. *Metab.Eng.* Vol 2: 140-148.

Newman DJ., Cragg GM., and Snader KM. (2003): Natural Products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J. Nat. Prod.* Vol 66 (7) : 1022-1037.

Nitsch B and Kutzner H.J, 1969. Egg-Yolk agar as diagnostic medium for *Streptomyces*. *Experientia.* Vol 25: 113-116.

Nonomura, H. (1974). Key for classification and identification of 458 species of the streptomycetes included in the ISP. *J. Ferm. Technol.* Vol 52 : 78-92.

Nys S., Terporten P.H., Hoogkamp-Korstanje J.A.A et Stobberingh E.E, 2008. Trends in antimicrobial susceptibility of *Escherichia coli* isolates from urology services in The Netherlands (1998–2005). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* Vol 62: 126–132

O

Ochel H.J., Eichhorn K and Gademann G, 2001. Geldanamycin: the prototype of a class of antitumor drugs targeting the heat shock protein 90 family of molecular chaperones. *Cell Stress Chaperones.* Vol 6(2): 105–112.

O'Donnell A.G., Embley T.M and Goodfello, M, 1993. Future of Bacterial Systematics. In: *Handbook of New Bacterial Systematics*, London: Academic Press : 513 -524.

O'Donnell A.G., Minnikin D.E., Goodfellow M and Parlett J.H, 1982. The analysis of actinomycetes wall aminoacids by gas chromatography. *FEMS Microbiology Lett.* Vol 15. 75-78.

Ohnuki T., Imanaka T and Aiba S, 1985. Self-cloning in *Streptomyces griseus* of an *str* gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* Vol 1 : 85-94.

Omura S, 1986. Philosophy of new drug discovery. *Microbiol. Rev.* Vol 50: 259- 279.

Omura S., Tazaki K., Tanaka Y., Sakakibawa H., Aizawa M and Lukacs G, 1983. Valine is a precursor of n-butyrate unit in the biosynthesis of macrolide aglycone. *J. Antibiot.* Vol 36 : 614-616.

Omura S., Tanaka Y., Takahashi Y and Iwai Y, 1980. Stimulation of production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J. Antibiot.* Vol 33 : 1568- 1569.

Onaka H., Mori Y., Igarashi Y and Furumai T, 2011. Mycolic Acid-Containing Bacteria Induce Natural-Product Biosynthesis in *Streptomyces* Species. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 77 (2) : 400-406.

Overbye K.M and Barrett J.F, 2005. Antibiotics: where did we go wrong? *Reviews.* Vol 10 (1).

P

Panagiotou G., Andersen M.R., Grotkjaer T., Regueira T.B., Nielsen J and Olsson L, 2008. Studies of the production of fungal polyketides in *Aspergillus nidulans* by using systems biology tools. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 75 (7) : 2212-2220.

Pandey A., Shukla A and Madjumdar S.K, 2005. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an antibacterial antibiotic. *African Journal of Biotechnology.* Vol 4 (9) : 909-910.

Papagianni M, 2004. Fungal morphology and metabolite production in submerged mycelial processes. *Biotechnology Advances.* Vol 22 (3) : 189-259.

Pardee A.B., Li Y.Z, and Li C.J, 2002. Cancer therapy with beta-lapachone. *Cancer Drug Targets.* Vol 2: 227-242.

Park Y.S., Momose I., Tsunoda K. and Okabe M, 1994. Enhancement of cephamycin C production using soybean oil as the sole carbon source. *Appl. Microbiol Biotechnol.* Vol 40 : 773-779.

Pasti M.B., Pometto A.L., Nuti M.P and Crawford D.L., 1990. Lignin-solubilizing ability of actinomycetes isolated from termite (Termitidae) gut. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol 56(7): 2213-2218.

Pavia D.L., Lampman G.M., Kirz G.S and Vyvyan J.R, 2009. Introduction to spectroscopy. Fourth Edition.

Pethig R., Gascoyne P.R.C, McLaughlin J.A and Szent-Gyorgyi A, 1985. Enzyme-controlled scavenging of ascorbyl and 2,6-dimethoxysemiquinone free radicals in Ehrlich ascites tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* Vol 82 : 1439-1442.

Pfaller M.A and Diekema D.J, 2007. Epidemiology of invasive candidiasis: a persistent public health problem. *Clin Microbiol Rev.* Vol 20 : 133-163.

Pfefferle C., Theobald U., Gürtler H and Fielder H.P, 2000. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.* Vol 80 : 135-142.

Pohanka A, 2006. Antifungal Antibiotics from Potential Biocontrol Microorganisms. Ph.D. thesis, Faculty of Natural Resources and Agricultural Sciences Department of Chemistry, Swedish University of Agricultural Sciences, Uppsala.

Prauser H, 1964. Aptness and application of color for exact description of colors of *Streptomyces*. *Z. Allg. Microbiol.* Vol 4: 95-98.

Pridham T.G., Hesseltine C.W and Benedict R.G, 1958. A guide for classification of Streptomycetes according to selected groups: placement of starins in morphological groups sections. *Appl. Microbiol.* Vol 6 (1) : 52-79.

Pridham T.G., Anderson P., Foley C., Lindenfelser L.A., Hesselting C.W and Benedict RG, 1957. A section of media for maintenance and taxonomic study of *Streptomyces*. *Antibiotics Ann* : 947-953.

Pridham T.G and Gottlieb D, 1948. The utilization of carbon compounds by some actinomycetes as an aid for species determination. *J. Bacteriol.* Vol 56 (1): 107-114.

Prosser B.T and Palleroni N.J, 1976. *Streptomyces longwoodensis* sp. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology.* Vol 26 (3) : 319-322

R

Rodier J, 2005. L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eaux de mer. 8^{ème} ed. Dunod.

Rokem J.S., Eliasson-Lantz A and Nielsen J, 2007. Systems biology of antibiotic production by microorganisms. *Nat Prod Rep.* Vol 24 : 1262-1287.

S

Salem A.H., Elkhatib W.F and Noreddin A.M, 2011. Pharmacodynamic assessment of vancomycin-rifampicin combination against methicillin resistant *Staphylococcus aureus* biofilm: a parametric response surface analysis. *Journal of Pharmacy and Pharmacology.* Vol 63: 73–79

Saitou N and Nei M, 1987. The neighbor-joining method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* Vol 4: 404-425.

Sanchez S and Demain A.L, 2002. Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy. Microb. Technol.* Vol 31 : 895-906.

Sanglier J.J et Turjillo M, 1997. Substance bioactives produites par les actinomycètes et stratégie de selection des souches. *Bulltin de la Société Française et Microbiologie.* Vol 12 (13).

Saunders R.N., Metcalfe M.S and Nicholson M.L, 2001. Rapamycin in transplantation: A review of the evidence. *Kidney Int.* Vol 59 : 3-16.

Savini V., Sozio F., Catavittello C., Talia M., Manna A., Febbo F., Balbinot A., Di Bonaventura G., Piccolomini R., Parruti G., et D'Antonio D, 2008. Femoral Prosthesis Infection by *Rhodotorula mucilaginosa*. *Journal of Clinical Microbiology.* Vol 46(10) : 3544–3545.

Schlegel H.G, 1992. *General Microbiology*, 7th ed. Cambridge University Press.

Schulte T.W and Neckers L.M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother Pharmacol.* Vol 42 (4) :273-9.

Scriban R, 1999. *Biotechnologie*. 5^{ème} édition. Tec et Doc, Lavoisier, Paris

Sehgal S.N, 2003. Sirolimus: its discovery, biological properties, and mechanism of action. *Transplant Proc* **35** : 7S-14S.

Seifert H., Kaltheuner M and Perdereau-Remington F, 1995. *Micrococcus luteus* endocarditis : case report and review of the literature. Zentralblatt für Bakteriologie. Vol 282 (4) : 431-435.

Shirling E.B and Gottlieb D. 1966. Methods for characterization of *Streptomyces* species. Int. J. Syst. Bacteriol. Vol 16: 313-340.

Sierra G and Greuell E.H.M, 1957. Studies on bacterial esterases: (i) differentiation of a lipase and two di-esterases during the growth of *Pseudomonas aeruginosa* and some observations on growth and esterase inhibition; (ii) paper electroporosis of the esterases of *Pseudomonas aeruginosa*; (iii) influence of the composition of the culture media on the production of di-esterase and lipase of *Pseudomonas aeruginosa*. Antonie van Leewenhoek. Vol 23: 241-278.

Sierra G, 1957. A simple method for the detection of lipolytic activity of microorganisms and some observations on the influence of the contact between cells and fatty substrates. J. Microbiol. Serol. Vol 23: 15-22.

Sietshe de Boer A and Diderichsen B, 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *B.amyloliquefaciens*: a review. Appl. Microbiol. Biotechnol. Vol 36 : 1-4.

Silva Sousa C., Fermino Soares A.C and Silva Garrido M, 2008. Characterization of Streptomycetes with potential to promote plant growth and bio-control. Sci. Agric. (Piracicaba, Braz.). Vol 65: 50-55.

Skarbek J.D and Brady L.R, 1978. Preliminary taxonomic study of members of the order Actinomycetales that produce antibiotics of the Aureolic Acid Group. International Journal of Systematic Bacteriology. Vol 28 (1) : 54-66.

Smith R.J., Webb M.L, 2007. Analysis of drug impurities. Blackwell Publishing Ltd.

Sinnaeve G, 2001. Utilisation de la spectrométrie dans le proche infra-rouge pour le suivi de réactions de biotransformation. Thèse de doctorat, Faculté universitaire des Sciences agronomiques, 5030 Gembloux (Belgique).

Stackebrandt E. and Woese, C.R, 1981. Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. Curr. Microbiol. Vol 5 : 197-202.

Starck S.R. and Roberts R.W, 2002. Puromycin oligonucleotides reveal steric restrictions for ribosome entry and multiple modes of translation inhibition. RNA. Vol 8 : 890-903

T

Tacconelli E., De Angelis G., Cataldo M.A., Pozzi E and Cauda R, 2008. Does antibiotic exposure increase the risk of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) isolation. Journal of Antimicrobial Chemotherapy. Vol 61: 26–38.

Tamura K., Dudley J., Nei M and Kumar S, 2007. MEGA 4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. Mol. Biol. Evol. Vol 24: 1596-1599.

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. Vol 83 (6) : 523-528.

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 de Mycologie Médicale. Vol 19 (3) : 161-167.

Thakur D., Yadav A., Gogoi B.K and Bora T.C, 2007. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. J. med. Mycol. Vol 17: 242-249.

Thompson J.D., Higgins D.G and Gibson T.J, 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighing, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucl. Acids Res. Vol 22, 4673-4680.

Thomas M.G., Burkart M.D and Walsh C.T, 2002. Conversion of L-proline to pyrrolyl-2-carboxyl-S-PCP during undecylprodigiosin and pyoluteorin biosynthesis. Chemistry and Biology. Vol 9 : 171-184.

Tresner H.D., Davies M.C and Backus E.J, 1961. Electron microscopy of *Streptomyces* spore morphology and its role in species differentiation. J. Bacteriol. Vol 81 (1) : 70-80.

V

Van Dijk G and Ledant J.P, 1983. La valeur ornithologique des zones humides de l'Est algérien Biol. Cons : 215-226.

Vara J.A., Pulido D., Lacalle R.A and Jimenez A, 1988. Two genes in *Streptomyces alboniger* puromycin biosynthesis pathway are closely linked. Gene. Vol 69 : 135-140.

Vidaver A.K., Mathys M.L., Thomas M.E and Schuster M.L, 1972. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. Canadian Journal of Microbiology. Vol 18 : 705-713.

W

Watve MG., Tichoo R., Jog MM and Bhole BD, 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*. Arch. Microbiol. Vol 176: 386-390.

Waksman S.A, 1961. The Actinomycetes: Classification, identification and descriptions of genera and species. The Williams and Wilkins Company, Baltimore. Vol 2: 61-292.

Waksman S.A and Henrici A.T, 1948. Family II. Actinomycetaceae. Bergy's Manual of Determinative Bacteriology. 6th Ed : 892-928.

Wallhausser K.H., Neemann G., Prave P and Steigler A, 1966. Moenomycin, a new antibiotic. I. Fermentation and isolation. Antimicrob Agents Chemother : 734-736.

Williams S.T., Goodfellow M and Alderson G, 1989. Genus *Streptomyces* Waksman and Henrici, 1943. Bergy's Manual of Systematic Bacteriology. Vol 4 : 2469-2471.

Williams S.T., Goodfellow M and Wellington E.M.H., Sneath P.H.A and Sackin M.J, 1983a. Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. Journal of General Microbiology. Vol 129 : 1743-1813.

Wilmet A, 2000. Analyse de jus de fruit par spectroscopie dans le proche et le moyen infra-rouge. Mémoire de graduat. Haute Ecole Charleroi. Belgique.

Wehrli W. and Staehelin M, 1971. Actions of the rifamycins. Bacteriol rev. Vol 35 : 290-309.

Wu J., Guan T., Jiang H., Zhi X., Tang S., Dong H., Zhang L and Li W, 2009. Diversity of actinobacterial community in saline sediments from Yunnan and Xinjiang, China. Extremophiles. Vol 13 : 623-632.

Y

Schulte T.W and Neckers L.M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. Cancer Chemother Pharmacol. Vol 42 (4) :273-9.

Yokota A, 1997. Phylogenetic relationship of actinomycetes. Atlas of actinomycetes, Asakura Publishing Co. Ltd : 194-197.

Z

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

Zaitlin B., Watson S.B., Ridal J., Satchwill T and Parkinson D, 2003. Actinomycetes in Lake Ontario: Habitants and Geosmin and MIB production. Am. Water Works Assoc. J. Vol 95(2): 113-118.

Zhang W., Ames B.D., Tsai S.C and Tang Y, 2006. Engineered Biosynthesis of a Novel Amidated Polyketide, Using the Malonamyl-Specific Initiation Module from the Oxytetracycline Polyketide Synthase. Appl. Environ. Microbiol. Vol 72 (4) : 2573-2580

Zheng B., Tomita H., Inoue T et and Ike Y, 2009. Isolation of VanB-Type *Enterococcus faecalis* Strains from Nosocomial Infections: First Report of the Isolation and Identification of the Pheromone-Responsive Plasmids pMG2200, Encoding VanB-Type Vancomycin Resistance and a Bac41-Type Bacteriocin, and pMG2201, Encoding Erythromycin Resistance and Cytolysin (Hly/Bac). Antimicrobial and Chemotherapy. Vol 53(2) : 735-747.

Znidarsic P and Pavko A, 2001. The morphology of filamentous fungi in submerged cultivations as a bioprocess parameter. Food Technol Biotechnol. Vol 39(3) : 237–252.