



الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية
République Algérienne Démocratique et Populaire
وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
جامعة زيان عاشور-الجلفة

Université Ziane Achour -Djelfa

كلية علوم الطبيعة و الحياة

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie

قسم العلوم البيولوجية

Département de Biologie

Projet de fin d'étude

En vue de l'obtention du Diplôme de Master en Biologie

Spécialité : Microbiologie appliquée

Thème :

Recherche bibliographique sur l'isolement et l'usage de *Streptomyces*

Présenté par :

Etter Hadjer
Kebir Nesrine

Soutenu devant le jury :

Mr BOUTAIBA. S

M.C.A Université de Djelfa

Président.

M^{me} Rachdi. FZ

M.A.A Université de Djelfa

Promotrice.

Mr BELMAHDI.M

M.C.B Université de Djelfa

Examineur 1.

Mr KHALED KHODJA.Y

M.C.B Université de Djelfa

Examineur 2.

Année universitaire : 2020/2021



Remerciement



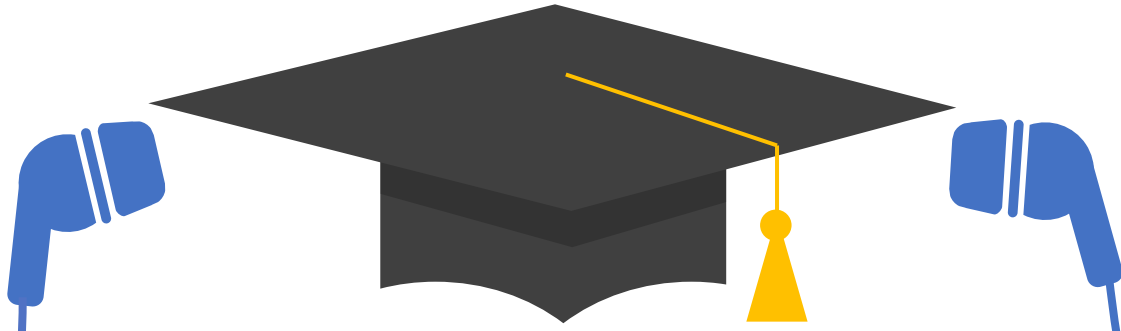
En tout premier nous remercions dieu « Allah » pour nous avoir donné la force, la patience, la volonté et le courage de terminer ce modeste travail, et pour nous avoir guidé vers la lumière de la recherche du savoir et de la science.

Nous tenons à exprimer toutes nos gratitudees à Madame Rachedi FZ pour avoir encadré et dirigé ce travail avec une grande rigueur scientifique, merci madame pour les orientations.

Merci à tous les membres de jury, pour l'honneur qu'ils nous font en acceptant d'examiner ce mémoire.

Sans oublier tous les professeurs que ce soit du primaire, du moyen, du secondaire ou de l'enseignement supérieur. Merci.





Dédicace

Merci A mes chers parents, pour tous leurs sacrifices, leur amour, leur tendresse, leur soutien et leurs prières tout au long de mes études.

A la douceur femme de ma vie, ma chère mère. Je te dis merci pour tout ton amour, ta souffrance, ta patience, tu es toujours prêt à tout donner pour moi.

A mon cher père, merci d'être toujours là pour me donner confiance, courage, et votre travail pour nous obtenons le meilleur.

A ma petite sœur, Hanin pour ton encouragement, ta disponibilité. Que Dieu vous protège et vous avez le succès et le bonheur.

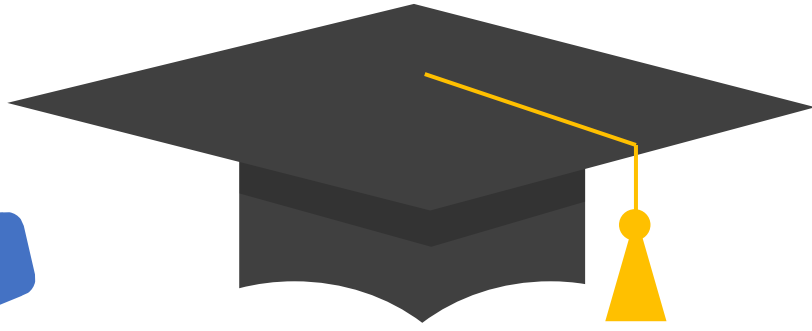
A ma meilleur amie, Farah Nada Noor qui fait toujours ressortir le meilleur en moi.

A ma belle amie, Cheriat dallel qui d'être la personne me remonter le moral quand je ne vais pas bien.

A mes chère frère Ahmed et Imad pour leur compréhension et leur soutien.

A ma famille et toutes les personnes que j'aime, Merci d'être toujours là pour moi.





Dédicace

*Je dédie affectueusement ce travail à :
Mes parents pour leur aide, leurs encouragements
incessants et leur soutien moral aux moments
difficiles. Qu'ils trouvent dans ce travail la preuve
modeste d'une reconnaissance infinie et d'un profond
amour.*

*Ma chère grand-mère et mon grand-père
Mes sœurs Mouna, Celina, Nada et Leticia*

Mes tentes et oncles

Toute la famille

Mes élèves et

Tous mes amis sans exception



Nesrine



ملخص:

تتضمن هذه الدراسة تقديم ببليوغرافي عن أهمية عزل واستخدام بكتيريا *Streptomyces* من أجل إنتاج المواد الحيوية النشطة للحد من ارتفاع نسبة مقاومة الكائنات الدقيقة للمضادات الحيوية المسببة للأمراض التي تؤدي إلى خسائر صحية واقتصادية.

ولتحقق من *Streptomyces* الموجودة في التربة يتم عن طريق عزل عينات من التربة المختلفة، وهذا العزل يتم باستخدام عدة وسائط مغذية من بينها SCA ، ISP2، ويتم انتقاء السلالات المرغوبة من خلال استعمال عوامل انتقائية مثل gentamicine و nystatine بتركيز دقيقة. وأيضاً يتم تحديد نوع العزلات من خلال دراسة الخصائص المورفولوجية، الكيميائية، الفيزيولوجية والجزئية.

كما يتطلب استخراج المواد الأيضية الثانوية من السلالات المختارة تطبيق العديد من التقنيات الكيميائية والفيزيائية حيث أن الجنس *Streptomyces* ينتج مجموعة واسعة ومتنوعة من المضادات الحيوية والعوامل المضادة للالتهابات التي توصف بأنها عوامل مكافحة بيولوجية.

الكلمات المفتاحية: *Streptomyces*، العزل، المواد الحيوية النشطة، العامل الحيوي.

Résumé :

Cette étude consiste à présenter une synthèse bibliographique sur l'isolement et l'usage de genre *Streptomyces* afin de mettre en évidence la production des substances bioactives. En raison de l'augmentation de la résistance de micro-organismes pathogènes aux antibiotiques qui cause des pertes économiques et sanitaire.

La présence de *Streptomyces* dans les sols a été réalisé par l'isolement à partir de différents échantillons de sols, cet isolement a été effectué sur plusieurs milieu de culture comme SCA, ISP2, la sélection des souches fait grâce à des agents sélectifs tels que la gentamicine et la nystatine avec concentrations bien précise. Aussi en basant sur l'identification des isolats par l'étude des caractéristiques morphologiques, chimiques, physiologiques et moléculaires des souches de *Streptomyces*.

L'extraction des métabolites secondaires des souches sélectionnées nécessitent l'application de plusieurs techniques chimiques et physico-chimiques tant que le genre *Streptomyces* produisent un large éventail des antibiotiques et antifongiques qui marque comme un agent biocontrôle.

Mots clés : *Streptomyces*, isolement, substances bioactives, agent de biocontrôle.

Abstract :

This study consists in presenting a bibliographical synthesis on the isolation and use of the *Streptomyces* genus in order to highlight the production of bioactive substances. Due to the increase in the resistance of pathogenic micro-organisms to antibiotics, which causes economic and sanitary losses

The presence of *Streptomyces* in soils was achieved by isolation from different soil samples, this isolation was carried out on several culture media such as SCA, ISP2, the selection of strains made through selective agents such as gentamicin and nystatin with precise concentrations. Also based on the identification of isolates by studying morphological, chemical, physiological and molecular characteristics of *Streptomyces* strains

The extraction of secondary metabolites from the selected strains requires the application of several chemical and physico-chemical techniques as the genus *Streptomyces* produces a wide range of antibiotics and antifungals that mark as biocontrol agents.

Key words : *Streptomyces*, isolation, bioactive substances, biocontrol agent

Sommaire :

Remerciement

Dédicace

ملخص

Abstract

Résumé

Liste des abréviations

Listes des figures

Listes des tableaux

Introduction.....	1
I. Chapitre 1 - Généralité sur les <i>Streptomyces</i>	3
I.1 Historique	3
I.2 Actinobactéries	3
I.3 <i>Streptomyces</i>	3
I.4 Cycle de développement	5
I.5 Sporulation et germination	6
I.5.1 Sporulation.....	6
I.5.2 Germination	7
I.6 Génétique de <i>Streptomyces</i>	8
I.7 Taxonomie de <i>Streptomyces</i>.....	9
I.7.1 Taxonomie numérique.....	9
I.7.2 Chimiotaxonomie	10
I.7.3 Taxonomie génétique	10
I.8 Milieux de culture de <i>Streptomyces</i>	11
I.8.1 Source de carbone	11
I.8.2 Source d'azote	12

I.8.3	Source de phosphate	12
I.9	Pathogenies de <i>Streptomyces</i>	12
II.	Chapitre 2 - Isolement, Identification et Importance de <i>Streptomyces</i>	14
II.1	Isolement des Actinobactéries « <i>Streptomyces</i> »	14
II.1.1	Prétraitement des échantillons	14
II.1.2	Préparation des dilutions et purification des échantillons	15
II.1.3	Milieu de base d'isolement	15
II.1.4	Sélection des souches	16
II.2	Identification des Actinobactéries « <i>Streptomyces</i> »	16
II.2.1	Critères morphologiques.....	16
II.2.1.1	Caractères macromorphologiques.....	16
II.2.1.2	Caractères micromorphologiques.....	17
II.2.2	Critères chimiques.....	18
II.2.2.1	Compositions pariétales : l'acide Diamino pimélique et acides aminés	18
II.2.2.2	Composition membranaire et pariétale en lipides	18
II.2.3	Etude biochimique et physiologique	19
II.2.4	Etude moléculaire.....	19
II.2.4.1	Séquençage du gène codant pour l'ARN 16S	19
II.2.4.2	Hybridation ADN-ADN.....	20
II.2.4.3	Pourcentage de guanine-cytosine	20
II.2.4.4	Séquençages de nouvelles génération (SNG).....	21
II.3	Métabolisme de <i>Streptomyces</i>	21
II.3.1.1	Métabolites secondaires	22
II.3.1.2	Activités des métabolites secondaires.....	23
II.4	Importance du genre <i>Streptomyces</i>	28
II.4.1	Importance dans domaine médical.....	28

II.4.2	Importance dans domaine biotechnologie industrielle	29
II.4.3	Importance dans domaine agriculture	30
III.	Chapitre 3 – Métabolites secondaires de <i>Streptomyces</i>	31
III.1	Biosynthèse de métabolites secondaires.....	31
III.2	Production de métabolites secondaires.....	31
III.3	Etude des antibiotiques	32
III.3.1	Mise en évidence de l'activité antagoniste	32
III.3.2	Production des antibiotiques.....	34
III.3.2.1	Effet de la composition du milieu de culture.....	35
III.3.2.2	Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation	36
III.4	Méthodes d'extraction des métabolites secondaires.....	37
III.4.1	Choix de meilleur solvant d'extraction.....	39
III.4.2	Purification et Caractérisation métabolites secondaires	39
III.4.2.1	Purification.....	39
III.4.2.2	Caractérisation.....	40
Conclusion	41
Références bibliographiques.....	42

Liste des abréviations

UFC : unités formant colonies

µm : micromètre

Mb: mega base

MS : mycélium a substrat

MA : mycélium aérien

G+C: Guanine + Cytosine

°C: *Celsius*

pH : Le potentiel d'hydrogène

RF : Rectus Flexibilis

RA : Retinaculum Apertum

ADN : Acide désoxyribonucléique

TP : Protéine terminale

TAP : Telomere-Associated protein

ARN_t: Acide ribonucléique de transfert

TIR : Terminal Inverted Repeats

Pb : Paires de bases

Kb : kilobase

ISP : Le projet international *Streptomyces*

RFLP : Le polymorphisme de longueur des fragments de restriction

ARN_r : Acide ribonucléique ribosomique

Pi : Phosphate inorganique

ATP : Adénosine triphosphate

NaCl : Chlorure de sodium

PCR : *Polymerase Chain Reaction*

PKS : Polykétide synthase

NRPS : Synthétases de peptides non- ribosomiques

CCM : Chromatographie sur couche mince

IR : Infra rouge

L-DAP : acide L-diaminopimélique

MS : Spectre de masse

UV : Ultraviolet

RF : Rapport frontal

RMN : Résonance Magnétique Nucléaire

SCA : Milieu sélectif Caséine-Amidon

SARM : *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline

Liste des figures

N°	Intitulé	Pages
01	A) Coupe verticale d'une colonie de <i>Streptomyces</i> . B) Schéma montrant la production de l'antibiotique undecylprodigiosine (rouge) le mycélium viable (noir) et les cellules mortes (blanc).	4
02	Cycle de développement des <i>Streptomyces</i> sur milieu solide.	6
03	Types de chaînes de spores trouvées dans les espèces de <i>Streptomyces</i> .	7
04	Figure présente la germination des spores de <i>Streptomyces</i> . L'illustration schématique d'une spore en germination et d'images microscopiques électroniques de spores en dormance (a, b) et de spores en germination (c–e) de <i>Streptomyces coelicolor</i> . (BOBEK, 2017)	8
05	Structure de chromosome de <i>Streptomyces</i> . TIR: Terminal Inverted Repeats, Ori: origine de réplication	9
06	Séchage des échantillons de sol dans un dessiccateur sous vide.	14
07	Croissance d'un isolat d'actinobactérie sur milieu agar de caséine et amidon. a. mycélium aérien. b. mycélium de substrat	15
08	Aspect macroscopique des colonies d'actinobactéries sur milieu ISP2 à 30 °C pendant 7 jours.	17
09	Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de <i>Streptomyces</i> sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 32°C /7 jours	18
10	Exemple de structure de différentes classes d'antibiotiques produits par <i>Streptomyces</i>	26
11	-Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées	33
12	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne des isolats d'actinobactéries sur milieu Mueller-Hinton par la méthode des cylindres d'agar	34

Liste des tableaux

N°	Intitulé	Pages
01	Tableau rassemble les différentes propriétés de <i>Streptomyces</i>	05
02	Spécificité des techniques moléculaires appliquées à la taxonomie de <i>Streptomyces</i>	11
03	Cas signalés dans le passé d'infections non mycétomiques invasives aux <i>Streptomyces</i> .	13
04	Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires	22
05	Propriétés physicochimiques des solvants utilisés dans l'extraction des métabolites secondaires	38

Introduction



Introduction

Au cours des deux dernières décennies, l'émergence de micro-organismes résistants aux antibiotiques est devenue un problème de santé publique. (ANGEBAULT et ANDREMONT.,2013)

Les maladies infectieuses causées par des micro-organismes pathogènes tels que les bactéries, les virus, les parasites ou les champignons affectent des millions de personnes dans le monde (ALWASH *et al.*, 2013). Les antibiotiques ont constitué une découverte thérapeutique importante pour la santé humaine. Leur utilisation a permis de diminuer le taux de mortalité et de morbidité mondiale depuis longtemps. Cependant, le mauvais usage de ces agents antimicrobiens et leur utilisation accrue ont eu pour conséquence de faire apparaître certaines formes de résistances des souches microbiennes contrebalançant les effets des antibiotiques. (GOOSSENS *et al.*, 2005)

En raison de la résistance croissante des micro-organismes pathogènes aux antibiotiques, la recherche s'est intensifiée pour découvrir de nouvelles molécules bioactives. Plusieurs études publiées ont signalé l'émergence de nouvelles souches bactériennes résistantes à de nombreux antibiotiques, y compris certaines céphalosporines de 3ème et 4ème génération utilisées en clinique (KATSUMI *et al.*, 2005 ; SEKHSOKH *et al.*, 2008). Parmi les principales bactéries multirésistantes, le *Staphylococcus aureus* résistant à la méthicilline (SARM) est la bactérie à Gram positif la plus à l'origine d'importantes infections communautaires (SARM) et hospitalières (SARM-HA), ainsi que à un degré moindre, de certaines souches de *S. aureus* résistant à la vancomycine (SARV). (REBIAHIA *et al.*, 2011)

L'augmentation de la résistance des bactéries aux antibiotiques est un problème mondial sérieux qui a orienté la recherche pour l'identification de nouvelles biomolécules avec une large activité antibactérienne (BOUYAHYA *et al.*, 2016). Parmi les antibiotiques d'origine naturelle sont en grande partie produits par les actinomycètes ou bien les actinobactéries, sont les microorganismes plus largement distribués dans la nature qui habitent principalement dans les sols (GOODFELLOW *et al.*, 2012). Parmi les actinobactéries, environ 7600 composés sont produits par les espèces *Streptomyces*. Ce dernier est considéré parmi les meilleurs candidats pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. Ce genre bactérien est à l'origine d'environ 80 % de molécules actives produites à

l'échelle industrielle pour les applications pharmaceutiques. Ce genre sécrète près de la moitié des antibiotiques naturels d'origine microbienne. (SOLECKA *et al.*, 2012)

Streptomyces est le genre dominant chez les actinobactéries à Gram positif, et leurs espèces sont connues pour être des producteurs d'antibiotiques naturels, d'agents antitumoraux, d'enzymes et d'autres métabolites (HAMED I *et al.*, 2017). Les expériences menées au cours des 20 dernières années ont accumulé des preuves de souches du genre *Streptomyces*. Il a un effet antifongique sur divers agents pathogènes du sol et des cultures, notamment *Curvularia*, *Aspergillus niger*, *Fusarium*, et *Alternaria*, *Phytophthora capsici*, *Colletotrichum*, *Rhizoctonia*, *Penicillium*, *Cercospora lutea*, *Citrus*, *Magnaporthe*. (OSKAY., 2009 ; LIU *et al.*, 2009 ; LAW *et al.*, 2017 ; NGUYEN *et al.*, 2017)

C'est dans ce contexte que s'inscrit notre étude, consiste à faire une recherche bibliographique sur les techniques d'isolement et d'identification (morphologique, chimique, physiologique et moléculaire) des souches de *Streptomyces* et avoir une aperçu générale sur l'usage de ses substances bioactives sécrétées dans différents domaines médicaux, agriculture et l'industrie pharmaceutique après décrire les techniques d'extraction, purification et caractérisation et même connaître les méthodes utilisées pour améliorer sa production.

Notre mémoire a été réalisé en trois chapitre dans le contexte suivant :

Le premier chapitre est consacré à une synthèse bibliographique sur les *Streptomyces*, ensuite le deuxième chapitre en vue des notions bibliographiques fondamentales sur l'isolements des souches de *Streptomyces* et l'identification de l'isolat. Enfin le troisième chapitre en termine par les techniques d'extraction, purification et caractérisation des métabolites bioactives.

Chapitre 1



I. Chapitre 1 - Généralité sur les *Streptomyces*

I.1 Historique

Les produits naturels ont contribué le plus médicaments dans l'histoire de la médecine. Sur les 520 nouveaux médicaments approuvés entre 1983 et 1994, 39 % étaient des produits naturels ou dérivés de produits naturels et 60 à 80 % des médicaments antibactériens et anticancéreux étaient dérivés de produits naturels (HARVEY, 2000). Parmi eux, les *Streptomyces* ont été rencontrés pour être le genre le plus abondant isolé dans chacune des études (ANANDAN *et al.*, 2016). Le genre *Streptomyces* a été proposé par Waksman et Henrici (1943) et englobe actuellement près de 600 espèces d'actinomycètes aérobies sporulés (EUZEBY, 2012). En effet, que les *Streptomyces* sont responsables de la production de métabolites secondaires pertinents qui ont un large éventail d'activités, telles que les antibactériens, antifongiques, anticancéreux, antitumoraux, cytotoxiques, cytostatiques, anti-inflammatoires, antiparasitaires, antipaludéens, antiviral, et antioxydant. (JANARDHAN *et al.*, 2014)

I.2 Actinobactéries

Les actinobactéries sont des bactéries Gram-positives filamenteuses à haute teneur en G+C, et sont les plus largement distribuées dans la nature, habitant principalement les sols (GOODFELLOW *et al.*, 2012). Parmi elles, le genre *Streptomyces* est une composante prédominante de la population microbienne dans les sols et a fait l'objet d'importants efforts d'isolement et de criblage au fil des ans parce qu'il est une source majeure de métabolites secondaires importants sur le plan commercial et thérapeutique (BERDY, 2012). On estime qu'environ 45 % des antibiotiques naturels ont été isolés à partir d'actinobactéries, et qu'environ 75 % des molécules bioactives provenant des actinobactéries sont produites par des membres du genre *Streptomyces*. (SOLECKA *et al.*, 2012)

I.3 *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses Gram-positives appartenant au groupe des actinobactéries, qui contient la plupart des espèces bactériennes du sol. On estime qu'un gramme de sol contient 10^9 UFC (unités formant colonies), dont 10^7 sont des actinobactéries (BALTZ, 2007). Par conséquent, *Streptomyces* est un organisme procaryote avec une structure filamenteuse (**Figure 1**). Ceci explique leur dénomination : du Grec Strepto.myces "Streptos" tordu ou courbé et "myces" champignons (WILLIAMS *et al.*,

1989). Les *Streptomyces* représentent le genre majoritaire de Streptomycètes (95,34 %) qui compte un très grand nombre d'espèces. En effet, plus de 500 espèces sont actuellement associées à ce genre, bien que le pourcentage guanine et cytosine se situe entre 69 et 73%. Ce sont des bactéries du sol filamenteux avec des hyphes de longueur variable, allant de 0,5 à 2,0 μm de diamètre. Ces bactéries sont aérobies strictes et a Gram positif. Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux, d'autres sont phytopathogènes. La plupart des souches de *Streptomyces* contient des plasmides, qui peuvent être circulaires ou linéaires. (SAFFROY, 2006)

Les espèces de *Streptomyces* existent principalement dans le sol et vivent comme des saprophytes (HOPWOOD, 2007). Certaines espèces ont récemment été décrites dans la rhizosphère des racines des plantes et d'autres tissus végétaux (CASTILLO *et al.*, 2002 ; TOKALA *et al.*, 2002), isolées de fourmis coupeuses de feuilles (KOST *et al.*, 2007) et également associées à des espèces d'éponges marines. (ZHANG *et al.*, 2008)

De plus, *Streptomyces* est la source la plus importante de métabolites secondaires qui présentent une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale : agents antibactériens (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), agents antifongiques (nystatine), agent antiviral (tunicamycine), agent antiparasitaire (avermectine), immunosuppresseur (rapamycine), antitumoral (actinomycine, mitomycine C, anthracycline), Inhibiteur enzymatique (acide clavulanique) (DEMAIN, 2000). Ce genre est notamment connu pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit. (WATVE *et al.*, 2001)

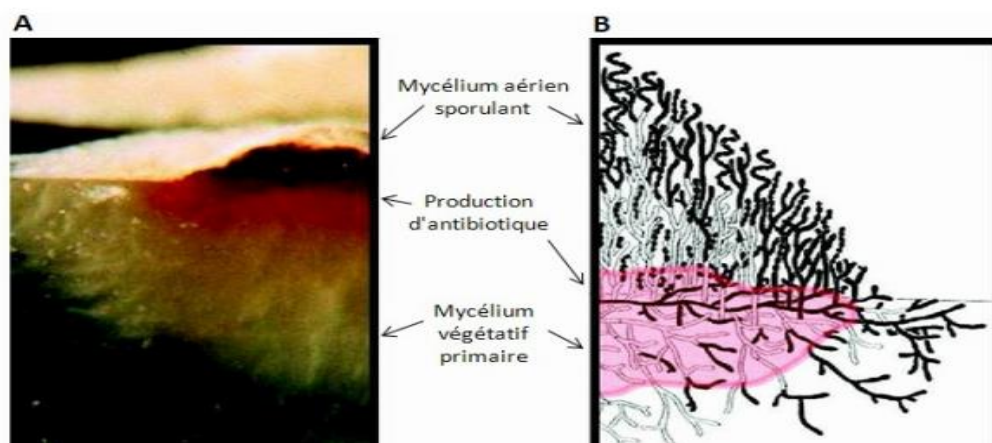


Figure 01- A) Coupe verticale d'une colonie de *Streptomyces*. B) Schéma montrant la production de l'antibiotique undecylprodigiosine (rouge) le mycélium viable (noir) et les cellules mortes (blanc). (CHATER., 2006)

Tableau 01 : Tableau rassemble les différentes propriétés de *Streptomyces*

Caractéristiques	Propriétés
Mode de respiration	Aérobie (HWANG, 2014)
Catégorie	Bactérie Gram-positif (HWANG, 2014).
Cycle de vie	Bactéries du sol qui présentent une croissance filamenteuse à partir d'une seule spore. Au fur et à mesure que leurs filaments se développent par l'extension de l'extrémité et la ramification, ils forment finalement un réseau de filaments ramifiés appelé mycélium de substrat (HWANG, 2014)
Matériau génétique	Possèdent un chromosome linéaire, d'environ 8 à 10 Mb selon les espèces, avec un contenu GC élevé (69 à 73 % molaire) et plusieurs plasmides sous forme linéaire ou circulaire. (HWANG, 2014)
Génome	La présence de groupes de gènes de biosynthèse qui codent pour des enzymes contribuant à la production de métabolites secondaires. (HWANG, 2014)
Paroi cellulaire	La présence d'acide L-diaminopimélique (L-DAP) et de glycine. (SABAOU, 2017)
Sucres	Contenaient des sucres non caractéristiques tels que le ribose, le glucose et le galactose. (SABAOU, 2017)
Lipide	La membrane cellulaire contenait de la phosphatidyléthanolamine. (SABAOU, 2017)

I.4 Cycle de développement

Les streptomycètes peuvent utiliser un grand nombre de composés organiques comme source de carbone et d'énergie. La température optimale de croissance se situe entre 25°C et 35°C. Ce sont en majorité des souches mésophiles, mais il existe quelques souches psychrophiles ou thermophiles. La gamme de pH optimale est comprise entre 6,5 et 8, la croissance peut se conduire en milieu liquide ou solide. Cependant, l'étude d'un cycle complet de différenciation se réalise préférentiellement en milieu solide. (SAFFROY, 2006)

Streptomyces a un cycle de développement complexe, divisé en plusieurs étapes. Sur le milieu solide (**Figure 2**), il débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un

mycélium primaire formé d'hyphes non septés et plurinucléés, ramifié et ancré dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium primaire. En effet, ce dernier s'est autolysé et le lysat a été rongé par le mycélium aérien. Les extrémités de la spirale des hyphes aériennes se divisent et se différencient pour former une chaîne de spores uninucléés, ces spores sont des agents de dissémination. (SMAOUI, 2010)

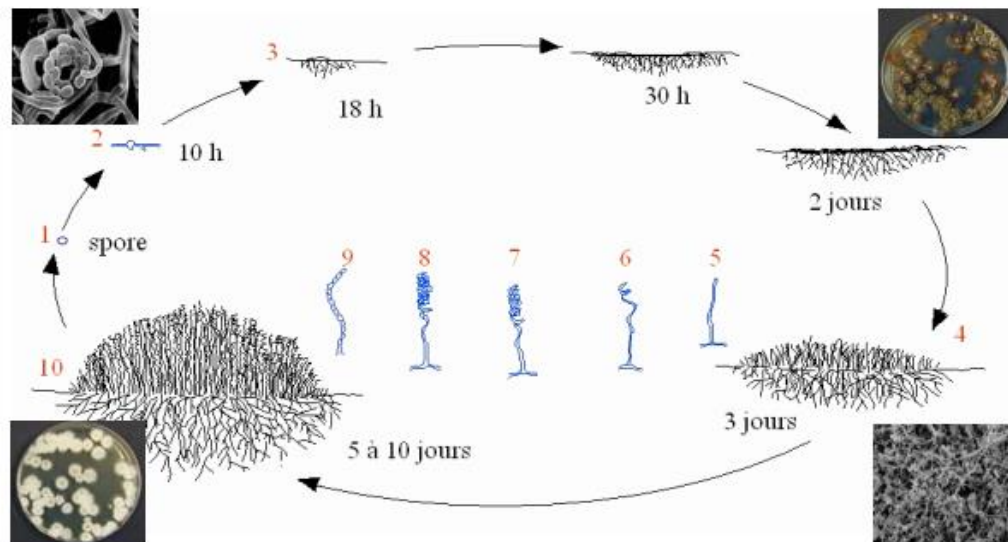


Figure 01 -Cycle de développement des *Streptomyces* sur milieu solide. (ZOUAGHI,2007)

10h : germination de spore, **18h à 2 jours** : croissance du mycélium de substrat, **3jours** : développement du mycélium aérien, **5 à 10 jours** : formation et croissance des spores.

Dans les milieux liquides, les cellules ne se développent que sous forme de mycélium primaire, se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif. bien que de très rares *Streptomyces* puissent sporuler dans cet environnement. Ainsi, en milieu solide, une différenciation morphologique (formation de mycélium aérien) est observée, alors qu'en milieu liquide, la différenciation est généralement physiologique. (SMAOUI,2010)

I.5 Sporulation et germination

I.5.1 Sporulation

Ce genre de *Streptomyces* est caractérisé par la formation d'un mycélium à substrat non fragmenté (MS) et d'un mycélium aérien (MA), produisant des sporophores qui forment des chaînes de spores (3-10, 10-50 ou plus de 50 spores par chaîne) qui peuvent être directement à flexuées (type RF = Rectus Flexibilis), accroché ou en boucle (type RA =

Retinaculum Apertum) ou en spirale (type S = Spira). Les sporophores ne sont généralement pas verticillés, sauf pour certaines espèces. (LOQMAN, 2009) (Figure 3).

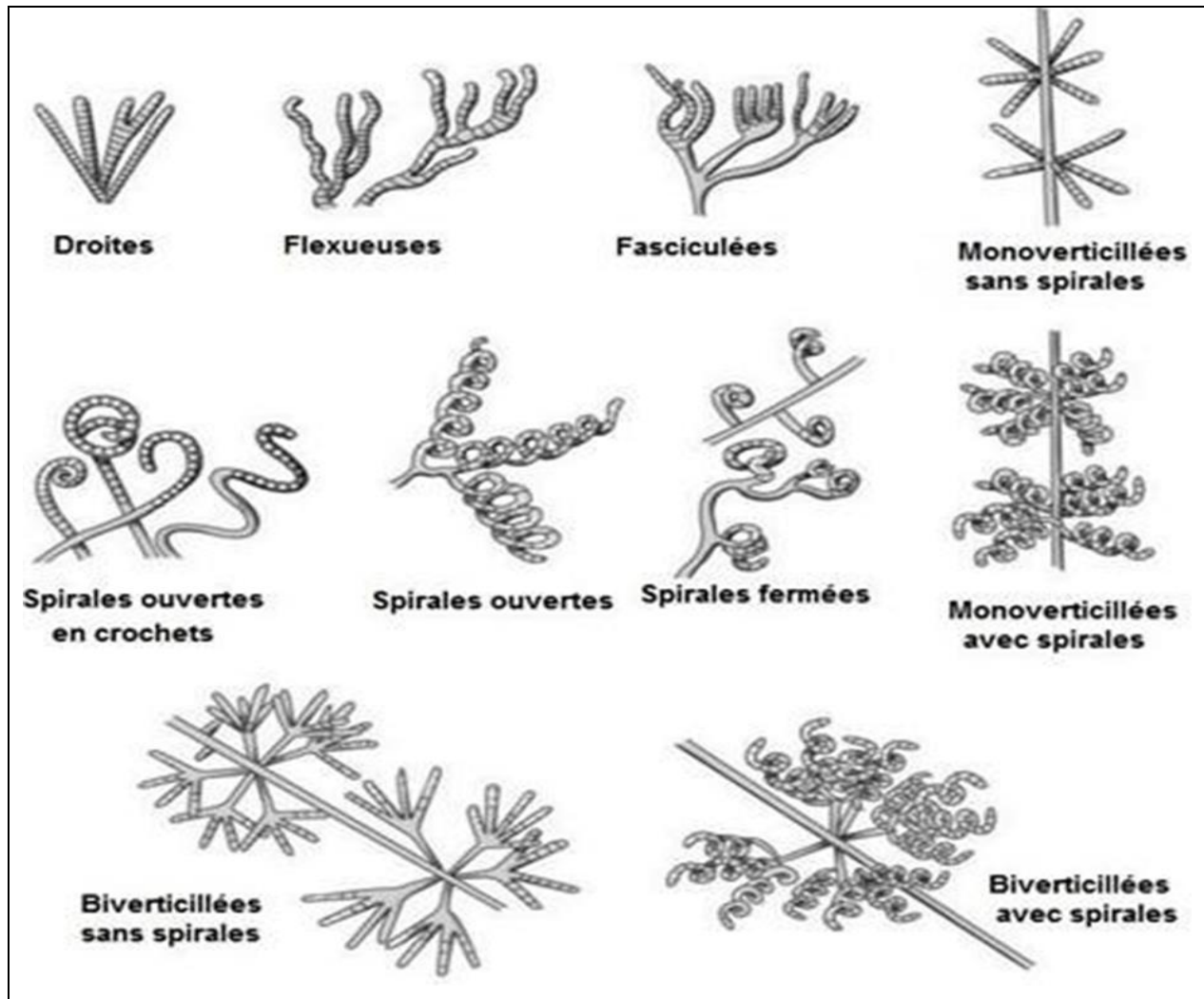


Figure 02 -Types de chaînes de spores trouvées dans les espèces de *Streptomyces*. (GOODFELLOW et al., 2012)

I.5.2 Germination

La germination est associée à une reconstruction complète de la cellule qui implique une activité métabolique fortement accélérée, des changements morphologiques qui commencent par le décollement de l'enveloppe, et reconstitution du contenu cellulaire. La germination des spores est processus séquentiel et peut donc être divisée en trois étapes distinctes : le noircissement, le gonflement et l'émergence du tube germinatif (HARDISSON et al., 1978) (Figure 4). De plus, la germination des spores dans les *Streptomyces* représente un modèle d'étude exceptionnel de différenciation cellulaire bactérienne qui présente une

transformation complète de la morphologie cellulaire et la restauration de tous les processus physiologiques. (BOBEK, 2017).

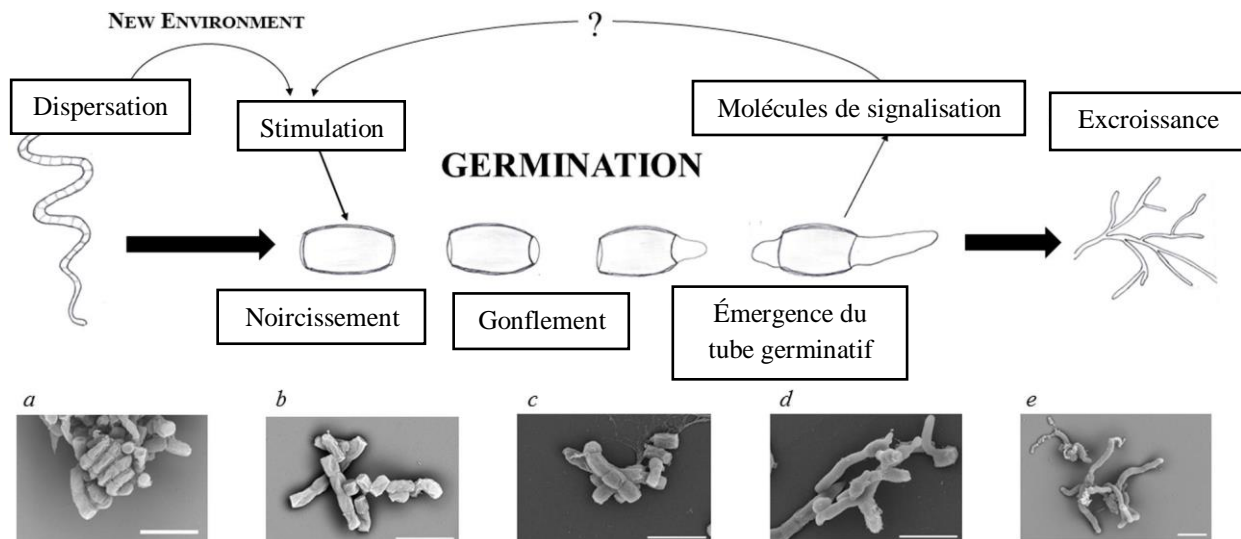


Figure 03 - Figure présente la germination des spores de *Streptomyces*. L'illustration schématique d'une spore en germination et d'images microscopiques électroniques de spores en dormance (a, b) et de spores en germination (c–e) de *Streptomyces coelicolor*. (BOBEK, 2017)

I.6 Génétique de *Streptomyces*

Le génome de *Streptomyces* est caractérisé par des niveaux élevés de guanine et de cytosine (G + C). Cette richesse varie de 60% à 80%, selon la nature du gène et de l'espèce, ce qui résulte un usage des codons hautement biaisé par les *Streptomyces* avec une dominance remarquable de G ou C à la troisième position du codon variant de 76 à 98% (WRIGHT et BIBB., 1992). L'ADN chromosomique de *Streptomyces* a une taille moyenne estimée par des expériences d'électrophorèse en champ pulsé, environ 8000 kilobases (OSTAH *et al.*, 2009). C'est l'un des plus grands génomes bactériens. *Streptomyces* est une bactérie rare avec un chromosome linéaire et l'origine de réplication est située au centre du chromosome (KOLSTO, 1997). La réplication s'effectue de façon bidirectionnelle à partir de l'origine de réplication oriC moyenne. La protéine TP (protéine terminale) est liée de manière covalente à l'extrémité 5'. Cette protéine, associée à la protéine TAP (Telomere-Associated protein) permet la synthèse du dernier fragment d'Okazaki sur le brin retardé. (HAAS, 2015)

De plus, les chromosomes de *Streptomyces* sont décrits comme étant organisés en différentes parties (**Figure 5**). On distingue le « cœur », la partie centrale qui contient tous les gènes essentiels : métabolisme primaire, réplication de l'ADN, division cellulaire, ribosomes et ARN. D'autre part, les « bras » contiennent des gènes non essentiels (dans des conditions de laboratoire), en particulier ceux impliqués dans le métabolisme secondaire. Cela dit,

certaines gènes du métabolisme secondaire sont présents dans la partie centrale. Enfin, les TIR, régions inversées répétées (Terminal Inverted Repeats), comme son nom l'indique, est la même séquence inversée située à l'extrémité du chromosome. Leur taille est très variable, de 174 pb chez *S. avermitilis* (IKEDA *et al.*, 2003) à 550 kb chez *S. rimorus*. (HAAS, 2015)



Figure 05 -Structure de chromosome de *Streptomyces*. (HAAS,2015)

Note : TIR : Terminal Inverted Repeats, Ori : origine de réplication.

I.7 Taxonomie de *Streptomyces*

Le genre *Streptomyces* est taxonomiquement situé dans l'ordre bactérien diversifié des Actinomycetales est classé dans la famille des *Streptomycetaceae* qui a été proposé par Waksman et Henrici (1943), sur la base de la morphologie et ensuite du chémotype de la paroi cellulaire. (WILLIAMS *et al.*, 1983)

En 1964, le projet international *Streptomyces* (ISP) a été lancé pour introduire des critères standard pour la détermination des espèces afin de réduire le nombre d'espèces synonymes mal décrites. Ont décrit les critères standard qui impliquaient l'utilisation de la morphologie des chaînes de spores, l'ornementation de la surface des spores, la couleur des spores, le mycélium du substrat et les pigments solubles, la production de pigment de mélanine et l'utilisation d'une gamme de sources de carbone, plus de 450 espèces de *Streptomyces* ont été redécrites. (WILLIAMS *et al.*, 1983).

Les différentes espèces de *Streptomyces* sont identifiées et classées par taxonomie numérique basée sur les caractères phénétiques qui a entraîné une réduction du nombre d'espèces de *Streptomyces* décrites, taxonomie génétique et chimiotaxonomie du fait de leur instabilité génétique. (SAFFROY, 2006)

I.7.1 Taxonomie numérique

La taxonomie numérique c'est un système de classification phénotypique qui consiste à regrouper le microorganisme au sein taxons en fonction de leur similitude. Le principe contraste avec les approches traditionnelles de la taxonomie des *Streptomyces* qui ont

généralement consisté à reconnaître les taxons sur la base de quelques caractères choisis subjectivement (WILLIAMS et al.,1983). La taxonomie numérique a été introduite pour permettre l'évaluation simultanée d'un grand nombre de traits phénotypiques par mené une étude taxonomique numérique des *Streptomyces* et des genres apparentés à chémotype de paroi cellulaire. L'ensemble des caractères utilisant 139 caractères unitaires. Les résultats ont été analysés par Williams *et al.* (1983), ont été retrouvé 19 groupes majeurs, 40 groupes mineurs et 18 groupes de souches uniques de *Streptomyces* (ANDERSON et WELLINGTON.,2001).

I.7.2 Chimiotaxonomie

Les méthodes chimiotaxonomiques sont utilisées depuis longtemps pour distinguer les streptomycètes des autres actinobactéries (LECHEVALIER et LECHEVALIER, 1970). Le développement de méthodes analytiques fiables, rapides et sensibles telles que l'électrophorèse, la chromatographie et la spectroscopie a conduit à l'élaboration d'approches chimiotaxonomiques alternatives pour la classification des *Streptomyces*. Parmi les outils d'analyse utilisé : Acides gras, analyse de cellules entières, tests biochimiques dans la taxonomie des *Streptomyces*, l'identification des phages, sérologie, profil protéique. (ANDERSON et WELLINGTON,2001)

I.7.3 Taxonomie génétique

Système de classification génotypique utilisé dans la biologie moléculaire a l'analyse des génomes bactériens, de principe permis de mieux comprendre les relations phylogénétiques des procaryotes au niveau du genre, de l'espèce et de la famille. Les différentes méthodes utilisant dans biologie moléculaires pour la classification des *Streptomycètes* sont obtenues dans le tableau suivant (ANDERSON et WELLINGTON,2001)

Tableau 02 - Spécificité des techniques moléculaires appliquées à la taxonomie des *Streptomycètes* (ANDERSON et WELLINGTON,2001).

Cible	Méthode	Spécificité
ADN chromosomique total	Hybridation ADN-ADN Restriction avec endonucléases (RFLP, LFRFA)	Genre à espèce Espèces à souche
Fragment d'ADN cloné ou amplifié au hasard	Isolement et clonage de fragments non hybrides	Espèces à souche
Gène ou fragment de gène codant pour une protéine	Isolement et séquençage de gènes ou de fragments de gène	Espèces à souche
ARNr ribosomique (16S/23S)	analyse comparative des séquences	Famille, genre, espèce

I.8 Milieux de culture de *Streptomyces*

Les colonies matures de *Streptomyces* cultivées sur milieu gélosé sont morphologiquement différenciées, puisque leurs parties inférieures sont constituées d'un mycélium végétatif ramifié et que leur surface supérieure est couverte d'hyphes aériennes portant des chaînes de spores (CHATER,1998). Tant que, la caractérisation morphologique des actinomycètes précisément les *Streptomyces* produisant spores dépend évidemment de l'utilisation d'un milieu de culture donnant une bonne sporulation. Les milieux standard qui ont donné de bons résultats et un bon développement du mycélium aérien sporulant parmi lesquels, gélose à l'extrait de levure et à l'extrait de malt, gélose à l'avoine, gélose aux sels inorganiques et à l'amidon, gélose au glycérol et à l'asparagine (SHIRLING et GOTTLIEB,1966).

De plus, la capacité de *Streptomyces* à produire des antibiotiques et d'autres composés bioactifs besoin des nutriments pour leur croissance tels que, source de carbone, source d'azote et phosphate, l'oxygène, la température, la vitesse de croissance, le contrôle par rétroaction, l'inactivation ou l'induction pour une production optimale d'antibiotiques (DA SILVA *et al.*,2012)

I.8.1 Source de carbone

Les milieux de production contiennent généralement une source de carbone rapidement métabolisable, telle que le glucose. Cette source de carbone peut dans certains cas exercer une répression catabolique soit sur la croissance soit sur la production des métabolites

secondaires. Cette répression catabolique est liée à la régulation soit de l'expression du gène de biosynthèse des enzymes impliquées, soit des activités enzymatiques impliquées dans la synthèse des métabolites (SAFFROY,2006). Il y a aussi d'autres sources ont été évalué, tels que glycérol, mannitol, lactose, Na-citrate, Na-acétate, saccharose, galactose, xylose, amidon, arabinose, fructose, maltose et ribose. (THAKUR *et al.*,2009)

I.8.2 Source d'azote

Les principales sources d'azote présentes dans les milieux de culture utilisés pour la production d'antibiotiques sont les ions ammonium (SAFFROY,2006), chlorure d'ammonium, sulfate d'ammonium et nitrate d'ammonium. Les acides aminés, arginine, asparagine, thréonine, acide glutamique, glycine, tyrosine, valine, acide aspartique, alanine et phénylalanine .et les nitrates, nitrate de sodium, nitrate de potassium. (THAKUR *et al.*,2009)

I.8.3 Source de phosphate

La principale forme utilisable du phosphore dans les bactéries est l'anion orthophosphate (PO_4^{3-}) connu sous le nom de phosphate inorganique (Pi). L'ion phosphate, joue rôles essentiels dans les cellules : il maintient la structure de l'ADN et de l'ARN, se combine avec les lipides pour fabriquer les membranes cellulaires, et forme des liaisons à haute énergie dans les molécules sous forme d'ATP (SANTOS-BENEIT,2015). Le phosphate se trouve également dans des polymères linéaires de longueur variable, fluctuant de dix à des centaines de molécules de phosphate liées par des liaisons phosphoanhydrides à haute énergie. Ces molécules sont essentielles pour la survie bactérienne pendant la phase stationnaire et pour l'adaptation au stress. (RAO *et al.*,2009)

I.9 Pathogenies de *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont des bactéries filamenteuses à Gram positif et des habitants du sol. Ils sont bien connus pour la production d'antibiotiques comme métabolites secondaires. Ils représentent rarement de véritables infections, en particulier dans un contexte polymicrobien. Les *Streptomyces* peuvent causer le mycétome, quand il se produit dans une extrémité inférieure, il est connu comme Madura pied, touche les tissus mous et les os (KAPADIA *et al.*,2007). En dehors des mycétomes, ils occasionnent rarement une infection chez l'homme. Cette infection rare peut être localisée peau, poumon, cerveau. (ZAYET *et al.*,2019)

Tableau 03 : Cas signalés dans le passé d'infections non mycétomiques invasives aux *Streptomyces*.

Isolate	Type d'infection	Localisation	Références
<i>Streptomyces sp</i>	Pneumonie	Ohio	(KOHN <i>et al.</i> , 1951)
<i>Streptomyces coelicolor</i>	Abcès au cerveau.	England	(CLARKE <i>et al.</i> , 1964)
<i>Streptomyces somaliensis</i>	Péritonite	Senegal	(GRUET <i>et al.</i> , 1970)
<i>Streptomyces pelletier</i>	Pneumonie	Suisse	(WERDER et SONNABEND, 1973)
<i>Streptomyces sp</i>	Péricardite chronique	Zaire	(SHANLEY <i>et al.</i> , 1979)
<i>Streptomyces sp</i>	Lymphadénite	New Jersey	(HOLTZ <i>et al.</i> , 1985)
<i>Streptomyces sp</i>	Pneumonie	Arizona	(CARON <i>et al.</i> , 1992)
<i>Streptomyces griseus</i>	Pneumonie	Nigéria	(GUGNANI <i>et al.</i> , 1993)
<i>Streptomyces sp</i>	Endocardite	Arabie Saoudite	(MOSSAD <i>et al.</i> , 1995)
<i>Streptomyces sp</i>	Pneumonie; arthrite Septique du genou	Pennsylvania	(AHMED <i>et al.</i> , 1996)
<i>Streptomyces sp</i>	Abcès pulmonaires.	Colorado	(DUNNE <i>et al.</i> , 1998)
<i>Streptomyces sp</i>	Circulation sanguine liée aux CVC infection	New York	(CAREY <i>et al.</i> , 2001)
<i>Streptomyces bikiniensis</i>	Circulation sanguine liée aux CVC infection	Maryland	(MOSS <i>et al.</i> , 2003)
<i>Streptomyces Thermovulgaris</i>	Infection du sang	London, England	(EKKELENKAMP <i>et al.</i> , 2004)

Les *Streptomyces* sont des pathogènes opportunistes, sont rarement pathogènes chez l'homme à l'exception de *Streptomyces somaliensis* et *Streptomyces griseus*, qui peut se produire au cours d'infection une dissémination hématogène, pouvant être responsable de localisations surtout orocervicales, mais aussi thoraciques, abdominopelviennes, du système nerveux central à type de mycétomes. (FAVRE *et al.*, 1998)

Chapitre 2



II. Chapitre 2 - Isolement, Identification et Importance de *Streptomyces*

II.1 Isolement des Actinobactéries « *Streptomyces* »

Pour l'isolement des actinobactéries, différentes méthodes peuvent être utilisées selon différentes sources et différents milieux. L'échantillon a été prélevé dans l'habitat. (SHARMA *et al.*,2014). De plus, l'obtention des actinobactéries est possible grâce à l'isolement sélectif par le prétraitement des sols à la chaleur, l'addition d'agents chimiques dans les milieux l'isolement tels que les antibiotiques et le benzoate. (MEKLAT,2012)

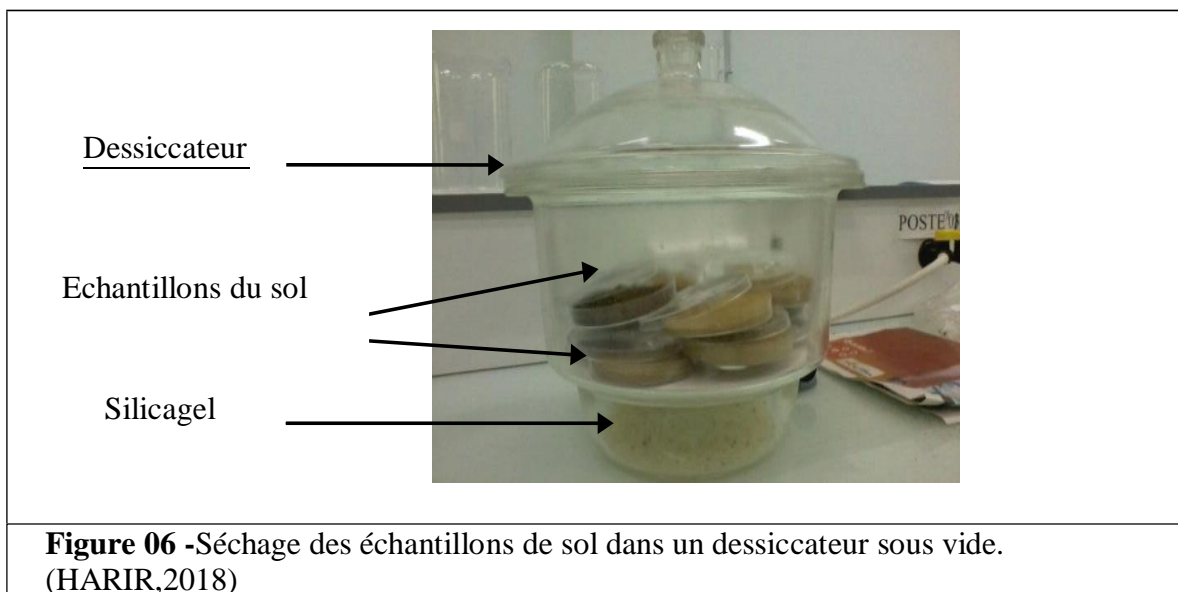
En effet, HARIR., (2018) est réalisé l'isolement des actinobactéries à partir des échantillons de sols non cultivés dans de régions arides et semi-arides. Les échantillons de sol ont été tout d'abord séchés puis broyés afin de faciliter l'isolement des bactéries. (HARIR,2018)

II.1.1 Prétraitement des échantillons

Les échantillons de sol sont prétraités pour tuer certaines bactéries indésirables et favoriser la croissance des actinobactéries. Pour cela, deux méthodes sont appliquées.

A / Le séchage séchés les échantillons de sol à température ambiante ou dans un dessiccateur sous vide pendant 7 jours (**Figure 6**). (HARIR,2018)

Ce prétraitement a pour effet de réduire la flore bactérienne indésirable, à l'exception des actinobactéries qui sont résistants à ce type de traitement. (SUWAN *et al.*, 2012)



B /Enrichissement des échantillons par le bicarbonate de calcium (CaCO₃)

Cette méthode consiste à mélanger 10 g d'échantillon de sol dans un mortier avec 1% de carbonate de calcium (CaCO₃) et incubé pendant 2 jours à 30 ° C dans une boîte de Pétri stérile.

Ce prétraitement a pour avantage d'augmenter le nombre d'actinomycètes et de réduire la croissance de la flore fongique et bactérienne contenue dans le sol. (HARIR,2018)

II.1.2 Préparation des dilutions et purification des échantillons

AYARY *et al.*, (2012) a montré des échantillons de sédiments ont été prélevés dans les sédiments du lac d'Oubeira, dans le nord-est de l'Algérie.

En effet, la méthode des suspensions dilutions réalisée comme suit: Un gramme de sédiments a été pris dans 9 ml d'eau distillée et agité vigoureusement pendant 1 min puis des dilutions décimales sont réalisées (10⁻¹ à 10⁻³) de la suspension, les dilutions ont été étalées sur des boîtes de Pétri contenant les milieux d'isolement sélectifs. Les boîtes ont été incubées à 28°C pendant trois semaines et les colonies ont été purifiées par stries sur milieu ISP2-agar (International *Streptomyces* Project 2-agar) (composition en annexe n°1). (AYARY *et al.*, 2012)

II.1.3 Milieu de base d'isolement

Le milieu de culture « milieu caséine-amidon » (SCA) recommandé par Shirling et Gottlieb (1966) est utilisé comme milieu de base pour les isollements (**Figure 7**).

Le milieu SCA est composé de : amidon, 10 g ; caséine, 0,3 g ; K₂HPO₄, 2 g ; KNO₃, 2 g ; CaCO₃, 0,02 g ; FeSO₄, 7H₂O, 0,01 g ; MgSO₄, 7H₂O, 0,05 g ; agar, 20 g ; H₂O, 1000 ml, pH 7,2. (AYARY *et al.*, 2012)

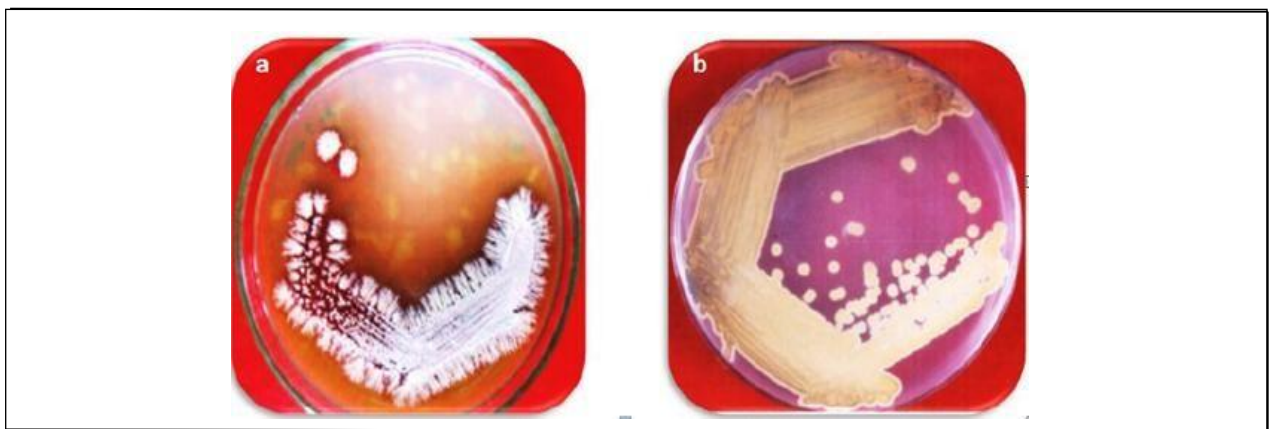


Figure 07- Croissance d'un isolat d'actinobactérie sur milieu agar de caséine et amidon. a. mycélium aérien. b. mycélium de substrat (ANANDAN *et al.*, 2016).

II.1.4 Sélection des souches

Le milieu de base SCA a été utilisé avec agents sélectifs avec des concentrations bien précises pour l'isolement et la sélection des souches de *Streptomyces*. Parmi ces agents utilisés par AYARY *et al.*, 2012, certains antibiotiques tels que gentamicine (10 µg/ml) et nystatine (25 µg/ml). (AYARY *et al.*, 2012)

II.2 Identification des Actinobactéries « *Streptomyces* »

L'identification bactérienne nécessite l'isolement de l'espèce sous forme de colonie. Traditionnellement, l'identification de l'espèce se faisait en combinant l'observation microscopique, macroscopique, physiologique, chimique et en étudiant les analyses moléculaires. (MEKLAT,2012)

Ainsi que, l'identification de la plupart des genres d'actinobactéries est basée sur la combinaison des critères morphologiques et des critères chimiques. (MEKLAT,2012)

II.2.1 Critères morphologiques

Des études morphologiques permettent parfois d'identifier certains genres ou groupes de genre. Ces normes comprennent l'appréciation et la description de certaines caractéristiques macro et micromorphologiques (AOUCHE,2013), qui font appel aux caractéristique culturelles sur différents milieux de culture. (HARIR,2018)

II.2.1.1 Caractères macromorphologiques

Les études macromorphologiques comprennent la détermination de la production ou non du mycélium aérien (MA) et la présence ou non du mycélium du substrat (MS), l'évaluation de la croissance des souches d'actinobactéries et l'observation si des pigments diffusibles (autres que mélanoides) dans le milieu de culture. Ces caractéristiques sont notées après 7, 14 et 21 jours d'incubation à 30°C sur les milieux ISP2(**Figure 8**), ISP3, ISP4 et ISP5 préconisés par Shirling et Gottlieb (1966), ainsi que sur le milieu Bennett (Waksman, 1961). Les couleurs du MA et du MS sont déterminées à l'aide d'une charte de couleur (Color Name Charts Illustrated with Centroid Color : ISCC-NBS). (AOUCHE,2013)

La production de pigments mélanoides par les isolats est observée après 3 à 5 jours sur les milieux ISP6 et ISP7. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

La composition des milieux de culture est donnée en annexe n° 1.

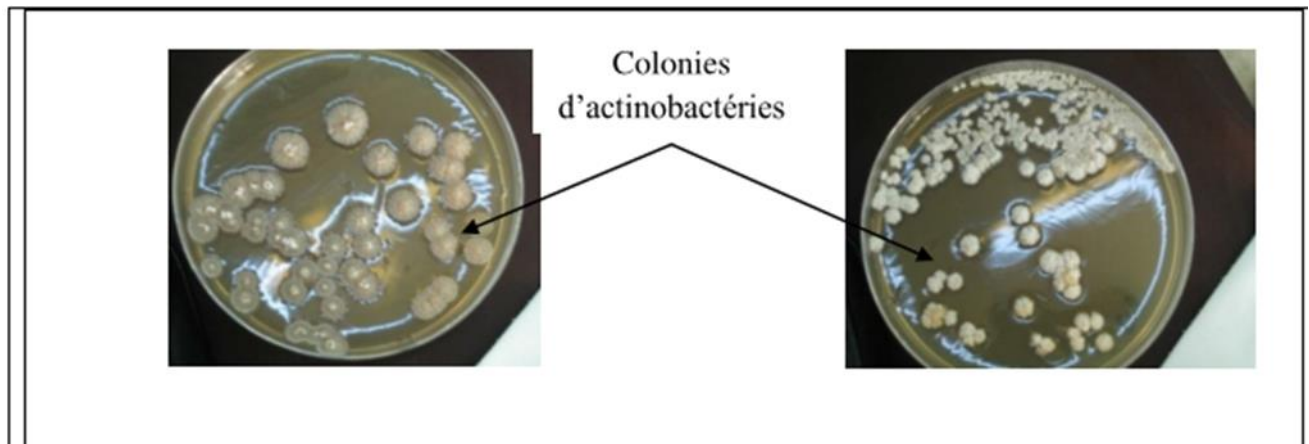


Figure 08-Aspect macroscopique des colonies d'actinobactéries sur milieu ISP2 à 30 °C pendant 7 jours. (HARIR,2018)

II.2.1.2 Caractères micromorphologiques

Les études des caractères micromorphologiques sont déterminés par observation directe au microscope optique (10 x 10 et 10 x 40). Des cultures poussant sur des milieux gélosés préconisés à cet effet. Afin d'observer certaines structures, il est parfois nécessaire d'amplifier le grossissement ou de faire usage d'un microscope électronique. (AOUCHE, 2013)

Les observations microscopiques (**Figure 9**) consistent à déterminer si le mycélium aérien est fragmenté ou non, stérile ou sporulant et de déterminer si les spores sont isolées ou regroupées, mobiles ou immobiles, sessiles ou portées par un sporophore. La présence ou non de certaines structures particulières telles que les sporanges (portés par des sporangiophores), les synnemata et les sclérotés doit aussi être signalé. L'étude micromorphologiques est essentielle pour la reconnaissance des genres. (AOUCHE, 2013)



Figure 09 -Mycélium du substrat avec des chaînes de spores de *Streptomyces* sur le milieu Amidon-Caséine incubée à 32°C /7 jours (SRIVIBOOL et SUKCHOTIRATANA.,2006).

II.2.2 Critères chimiques

L'études des critères chimiques consistent en la détermination de la composition pariétale en acides aminés, la composition cellulaire en sucres et la composition membranaire et pariétale en lipides. (AOUICHE,2013)

II.2.2.1 Compositions pariétales : l'acide Diamino pimélique et acides aminés

En fonction de genre *Streptomyces*, est caractérisé par une paroi de type IC (HOLT *et al.*, 1994), c'est-à-dire, présence de l'isomère LL de DAP (l'acide diaminopimélique) avec glycine et absence de sucres caractéristiques. (AOUICHE,2013)

La détermination de l'isomère de l'acide diaminopimélique et la présence ou l'absence de la glycine sont réalisées selon la méthode de Becker *et al.* (1964). (AOUICHE,2013)

La méthode de Becker est donnée en annexe n° 2.

II.2.2.2 Composition membranaire et pariétale en lipides

La composition de la membrane et de la paroi en lipides sont les critères chimiques de base pour l'identification des genres. En effet, différents genres peuvent avoir le même type chimique. Les lipides taxonomiquement importants sont représentés par les phospholipides, la ménaquinone, les acides gras et parfois l'acide mycolique. (BOUBETRA–BISKRI,2013)

Le genre *Streptomyces* est caractérisé par des phospholipides membranaires de type PII (LECHEVALIER *et al.*, 1977) et des acides gras iso- et trans-iso ramifiés, parfois insaturés et cyclopropioniques. (REZANKA *et al.*, 1984)

II.2.3 Etude biochimique et physiologique

Les critères physiologiques et biochimiques incluent la capacité des isolats à utiliser différents carbones. Ceci est mesuré sur une plaque contenant ISP9(annexe n° 1) avec la source finale de 1 % de carbone ajoutée. Incuber la plaque à 28°C et lire la croissance après 7, 14 et 21 jours (PRIDHAM *et* GOTTLIEB, 1948). De plus, il s'agit de suivre la croissance de la souche à différentes températures, à différents pH, en présence de différentes concentrations en NaCl, ainsi que l'utilisation d'azote (acides aminés), la dégradation de divers composés organiques (adénine, hypoxanthine, xanthine, caséine, gélatine, Tween 80, etc.), la résistance aux agents chimiques (antibiotiques, phénol, acide de sodium, lysozyme, etc.), ainsi que la tolérance à la salinité, à la température et au pH. Seuls les tests discriminants entre les espèces sont généralement utilisés. (AOUICHE,2013)

II.2.4 Etude moléculaire

Pour distinguer les espèces entre elles, les méthodes taxonomiques classiques (caractéristiques morphologiques, chimiques et physiologiques) ne suffisent pas et l'utilisation des méthodes moléculaires fiables est impérative. Elle consiste en l'application des méthodes d'analyses moléculaires, notamment l'hybridation ADN-ADN et le séquençage de l'ADN codant pour l'ARN ribosomique 16S, le pourcentage de guanine-cytosine, qui sont présentes les principales techniques pour l'identification moléculaires. (AOUICHE,2013)

Le genre *Streptomyces* est celui qui comporte le plus grand nombre d'espèces. En effet, il compte actuellement plus de 612 espèces définies sur la base du gène codant pour l'ARN 16S et de l'hybridation ADN-ADN. (LABEDA *et al*, 2012)

II.2.4.1 Séquençage du gène codant pour l'ARN 16S

Le séquençage du gène de l'ARN ribosomique 16S est actuellement l'approche la plus couramment utilisée dans la classification et l'identification microbienne en raison de sa propriété génétique et la grande quantité de séquence de gène d'ARN ribosomique 16S (environ 1500 paires de bases). (AOUICHE, 2013)

De point de vue pratique, après extraction de la totalité du génome, le gène codant pour l'ARN ribosomique 16S est amplifié par PCR (polymérase en chaîne), puis séquencé à l'aide d'un séquenceur. Comparer ensuite la séquence obtenue avec d'autres séquences homologues appartenant aux types d'espèces disponibles dans la base de données du génome. Afin de créer un arbre phylogénétique illustrant les différents liens, des logiciels

informatiques peuvent être obtenus gratuitement sur le Web. Par conséquent, utilisez d'abord des programmes informatiques (tels que Clustal W et Philip) pour traiter la séquence nucléotidique, puis utilisez d'autres programmes (tels que : MEGA 5) pour construire un dendrogramme en utilisant un ensemble d'algorithmes et de statistiques techniques pour calculer les liens phylogénétiques. (LABEDA et KROPPESTEDT, 2000)

II.2.4.2 Hybridation ADN-ADN

L'hybridation ADN-ADN est basée sur le calcul du taux de recombinaison de brins d'ADN (l'ensemble du génome) entre deux espèces. Ce principe correspond à la définition de l'espèce elle-même. D'un point de vue pratique, cette technologie est difficile à réaliser. Cependant, il est précis et essentiel de décrire de nouvelles espèces sur la base du taux de similarité basé sur l'André 16S. (AOUICHE, 2013)

En effet, si le pourcentage d'homologie entre les deux séquences d'ADN codant pour l'ARN 16S est supérieur ou égal à 97 %, seule l'hybridation ADN-ADN peut nous dire si les deux souches appartiennent à la même espèce (STACKEBRANDT et GOEBEL, 1994). Deux souches avec un pourcentage entre elles inférieur à 97% sont classées comme deux espèces différentes. (MEIER-KOLTHOFF *et al.*, 2013)

Concernant *Streptomyces*, il a montré une instabilité génétique considérable et supporte l'hybridation ADN-ADN. Mais l'hybridation peut être influencée par la présence de larges plasmides chez les *Streptomyces* (KIESER *et al.*, 2000).

Depuis plus d'une décennie, 03 génomes de trois espèces de *Streptomyces* ont été complètement séquencés. IL s'agit de l'espèce *S. Coleicor* A3(2) (2002) ; *S. Avermitilis* (2003), *S. griseus* (2008) (HARIR, 2018).

II.2.4.3 Pourcentage de guanine-cytosine

L'introduction du pourcentage de guanine + cytosine dans la taxonomie revient à Chargaff en 1950 qui a montré que le contenu en bases puriques et pyrimidiques de l'ADN peut varier d'un individu à un autre mais est constant pour les individus de la même espèce. Ce pourcentage varie entre 25 et 75% chez les bactéries. Actuellement, on admet que des bactéries dont les G + C diffèrent de plus de 5% ne peuvent appartenir à une même espèce et que des bactéries dont les G + C diffèrent de plus de 10% ne peuvent appartenir à un même genre. Cependant, des valeurs du pourcentage en G + C identiques n'impliquent pas que les

bactéries soient proches entre elles car les bases peuvent être disposées de manière très différente sur l'ADN. (MEKLAT,2012)

La détermination du pourcentage de G + C doit être effectuée pour la souche-type de l'espèce-type d'un nouveau genre. Par contre, si la nouvelle espèce appartient à un genre déjà décrit, la détermination du pourcentage de G + C de sa souche-type est facultative. En effet, des bactéries ayant des pourcentages en GC supérieurs à 55% sont considérées comme faisant partie de la lignée des *Actinobacteria*. (EUZEBY, 2002)

II.2.4.4 Séquençages de nouvelles génération (SNG)

En 2005, un nouvel ensemble de méthodes de séquençage est apparu, qui permettent de réaliser du séquençage à très haut débit. Les avantages de ces technologies sont nombreux : pas d'étape de clonage bactérien (il n'y a donc pas de biais inhérent à la construction de la bibliothèque), rapidité (moins d'une semaine) et moindre coût (le coût par paire de bases de Solexa est environ 9000 fois moins cher que le séquençage Sanger). Ces nouveaux séquenceurs sont 454 (Roche), Solexa (Illumina), SOLID (Applied Biosystem), PacBio RS (Pacific Bioscience) et Ion Torrent (Life Technologies).

Nous sommes dans une période critique entre les technologies haut débit dites de deuxième génération, qui nécessitent l'amplification de molécules d'ADN en amont du décodage, et la technologie de troisième génération permettant le décryptage direct de molécules matrices d'ADN individuelles. La principale avancée apportée par SNG est la possibilité de générer de grandes quantités de données à moindre coût. La capacité de séquencer les génomes entiers de nombreux organismes ouvre des possibilités de comparaison à grande échelle et d'études évolutives qui étaient auparavant inimaginables. (HARIR,2018)

II.3 Métabolisme de *Streptomyces*

Salas *et al.*, (1984) ont rapporté la voie d'embden-Meyerhof (glycolyse), voie de catabolisme du glucose dans divers *Streptomyces*. Et la présence de phosphofructokinase (PFK) et de pyruvate kinase indiquent l'existence d'une voie de glycolyse complète. Dekleva et Strohl (1988) ont montré que la voie d'entner-Doudoroff n'est pas activée chez *S. lividans* et *S. aureofaciens*. Donc jusqu'à présent cette voie inexistante chez le genre *Streptomyces*. (SAFFROY, 2006)

➤ Métabolisme primaire et métabolisme secondaire

Le métabolisme secondaire est généralement opposé au métabolisme primaire qui regroupe l'ensemble des voies cataboliques et anaboliques indispensables à la survie et à la reproduction de la cellule (HAAS,2015). Au cours de leur croissance les *Streptomyces* peuvent passer d'un métabolisme dit primaire (trophophase) à un métabolisme dit secondaire (idiophase). Au cours de ces deux phases, des métabolites sont synthétisés. Leurs propriétés sont différentes en fonction de la phase au cours de laquelle ils sont synthétisés et sont résumées dans le tableau 1. (DELAUNAY *et al.*, 2003)

Tableau 04 : Principales différences entre les métabolites primaires et secondaires. (DELAUNAY *et al.*, 2003)

Métabolisme primaire	Métabolisme secondaire
Synthétisé pendant la trophophase	Synthétisé pendant l'idiophase
Présent tout au long du cycle cellulaire	Apparition à un moment du cycle cellulaire
Nécessaire à la croissance	Inutile pour la croissance
Rôle physiologique connu	Rôle physiologique mal connu
"Turn-over" élevé	"Turn-over" pratiquement nul
Produit dans des conditions de culture diverses	Produit dans des conditions de culture bien définies
Ubiquitaire	Spécifique
Enzymes à spécificité étroite	Enzymes à spécificité large
Voies de synthèse simple et courte	Synthèse longue et complexe
Synthèse d'un produit parfaitement défini	Synthèse d'un mélange de produits
Structure chimique généralement simple	Structure chimique souvent complexe
Concentration élevée	Concentration faible

II.3.1.1 Métabolites secondaires

Il y a plus d'un siècle, les métabolites secondaires ont été définis par Kossel (1891) par exclusion (composés qui n'appartiennent pas aux métabolites primaires). La spécificité du métabolisme secondaire a encouragé les botanistes et les mycologues à utiliser la production de métabolites secondaires comme caractéristique taxonomique chez les plantes. (KARLOVSKY,2008)

Par définition, les métabolites secondaires sont des substances présentes à l'état naturel, mais qui n'ont pas de rôle clair dans les organismes de production. Ils appartiennent à

différentes catégories chimiques. Jusqu'à aujourd'hui, leur rôle exact fait encore défaut dans la recherche, mais ils peuvent apporter un avantage. Des organismes producteurs (LIRAS et MARTIN,2004) et cela augmente la probabilité de survie des organismes qui les produisent car ils agissent comme des mécanismes de défense alternatifs (JENKE-KODAMA *et al.*, 2008). Les métabolites secondaires comprennent : les antibiotiques, les pigments, les toxines, les phéromones, les enzymes inhibitrices, les immunomodulateurs, les insecticides, les agents anti-tumoraux, etc. (LANCINI et DEMAIN, 2013)

➤ Métabolisme secondaire de *Streptomyces*

Tout d'abord, durant l'âge d'or de la découverte des antibiotiques tester des *Streptomyces* pour leurs activités antibiotiques donna de très bons résultats et de nombreuses molécules encore en usage aujourd'hui furent découvertes. Ensuite, le séquençage de génomes de *Streptomyces* dans les années 2000 et leur analyse montra que ces organismes possèdent un métabolisme secondaire bien plus riche que ce qui était connu. (HAAS,2015)

L'une des caractéristiques uniques du génome des espèces *Streptomyces* est la présence de groupes de gènes de biosynthèse qui codent pour des enzymes contribuant à la production de métabolites secondaires ayant une variété de chimiotypes, y compris les polykétides et les polyphénols, des lactames, des peptides nonribosomiaux et des terpènes. (NETT *et al.*, 2009) De nombreux métabolites secondaires sont produits au cours de la phase de passage du mycélium de substrat à la sporulation, accompagnée d'une différenciation morphologique (par exemple, la formation du mycélium aérien multinucléé) et différenciation chimique (métabolisme secondaire). (HWANG *et al.*,2014)

Les *Streptomyces* sont les meilleurs candidats pour la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre bactérien est à l'origine d'environ 70% des molécules antibiotiques utilisées en médecine et 60% des antifongiques utilisés en agriculture (SUJATHA *et al.*, 2005). Plusieurs travaux ont été menés pour augmenter la production de métabolites d'intérêts à partir de ce genre bactérien. Il a été démontré l'importance majeure et l'implication de l'influence des conditions de culture de la bactérie productrice sur la production du ou des métabolites recherchés. (SMAOUI,2010)

II.3.1.2 Activités des métabolites secondaires

Les métabolites secondaires sont cependant des composés de faible poids moléculaire (MW<3000), chimiquement et taxonomiquement extrêmement diversifiés avec une fonction obscure, caractéristique principalement de certains types spécifiques et distincts d'organismes (BERDY,2005). L'étude du métabolite secondaire ces dernières décennies a conduit à la

découverte de nombreuses molécules, le plus souvent dans une optique d'utilisation thérapeutique. Cette partie propose d'expliciter les différents usages possibles des métabolites secondaires. Etant donnée la part de molécules utilisées issues de *Streptomyces*, la grande majorité des exemples cités sont des composés synthétisés par ces bactéries. (HAAS,2015) bien que, l'utilisation médicale de métabolites secondaire ne sont pas seulement confinées aux antibiotiques mais comprennent également des antifongiques (par exemple, l'amphotéricine B), des anticancers (par exemple, la doxorubicine), des antiparasitaires (par exemple, l'ivermectine). (HWANG *et al.*,2014)

➤ Antimicrobiens

Les molécules de spécifite antimicrobiens et les composés similaires forment peut-être le plus intéressant, le plus dynamique augmentant, et l'un des groupes pratiquement le plus important des produits naturels (BERDY,2005). De plus, sont des produits du métabolisme bactérien et fongique, ils sont essentiellement produits après la phase de croissance. Parmi eux, les antibiotiques qui sont des molécules inhibent ou tuent d'autres micro-organismes à de faibles concentrations (MARINELLI,2009). L'histoire des antibiotiques a commencé avec la découverte de la pénicilline par Fleming dans les années 1940(HARIR *et al.*,2018). L'étendue de l'activité antibactérienne d'un antibiotique définit son spectre d'action. Plus un antibiotique agit sur des espèces bactériennes différentes, plus son spectre est large. L'action des antibiotiques peut s'exercer sur des structures ou des mécanismes essentiels à la croissance ou à la survie des bactéries (HARIR,2018).

II.3.1.2.1 Antibiotiques produits par le genre *Streptomyces*

Il est très bien connu que le genre *Streptomyces* produit la majorité des antibiotiques et des métabolites secondaires biologiquement actifs. près de 50% des espèces *Streptomyces* isolées de actinomycètes sont reconnues comme productrices d'antibiotiques (HARIR *et al.*,2018). Il existe plus de 60 substances à activité antibiotique produites par les espèces de *Streptomyces* sont utilisées non seulement dans le monde de la médecine vétérinaire et humaine, mais aussi dans le domaine de l'agriculture et de l'industrie (BENTLEY *et al.*,2002). Parmi les antibiotiques synthétisés par les *Streptomyces* : (chloramphénicol, kanamycine, streptomycine), antifongiques (amphotéricine, candicine, nystatine), des antiviraux (Ara -C, tunicamycine), des antiparasitaires (avermectine, hygromycine, salinomycine), immunosuppresseur (rapamycine)), des antitumoraux (actinomycine, anthracycline, mitomycine C), des insecticides (avermectine, milbémycine) et des herbicides (bialphos, phosphinothricine) (DEMAIN, 2000).

La découverte de la streptomycine est attribuée à Waksman *et al.* (1944) c'était le premier antibiotique produit par *Streptomyces*. En effet, les recherches de Waksman sur les actinomycètes aux États-Unis ont conduit à la découverte de plusieurs substances actives. L'actinomycine a été isolée en 1940, mais elle ne peut pas être utilisée pour lutter contre la tuberculose car elle est très toxique. En décembre 1941, Waksman et al. Isolent un nouveau composé chimique actif *in vitro* et *in vivo*, sur les bactéries à Gram positif et certaines bactéries à Gram négatif, qu'ils nomment streptothricine, mais il est impossible de l'utiliser chez l'homme en raison de sa toxicité cumulative. En 1943, Waksman a isolé le genre *Streptomyces griseus* de la gorge d'un poulet. Cette espèce sécrète une substance appelée streptomycine, dont le spectre antibactérien se rapproche de celui de la streptothricine, incluant en plus les mycobactéries. Les premiers essais cliniques sont effectués en 1944 et ont permis de sauver plusieurs milliers de personnes lors de l'épidémie de tuberculose survenue lors de la deuxième guerre mondiale. (AOUICHE,2013)

Durant les années 90, près de 500 nouveaux antibiotiques ont été découverts chaque année dont une part importante provenait des espèces de *Streptomyces*. (DEMAIN, 2000)

La figure 10 présente des exemples de structure de différentes classes d'antibiotiques produits par *Streptomyces*.

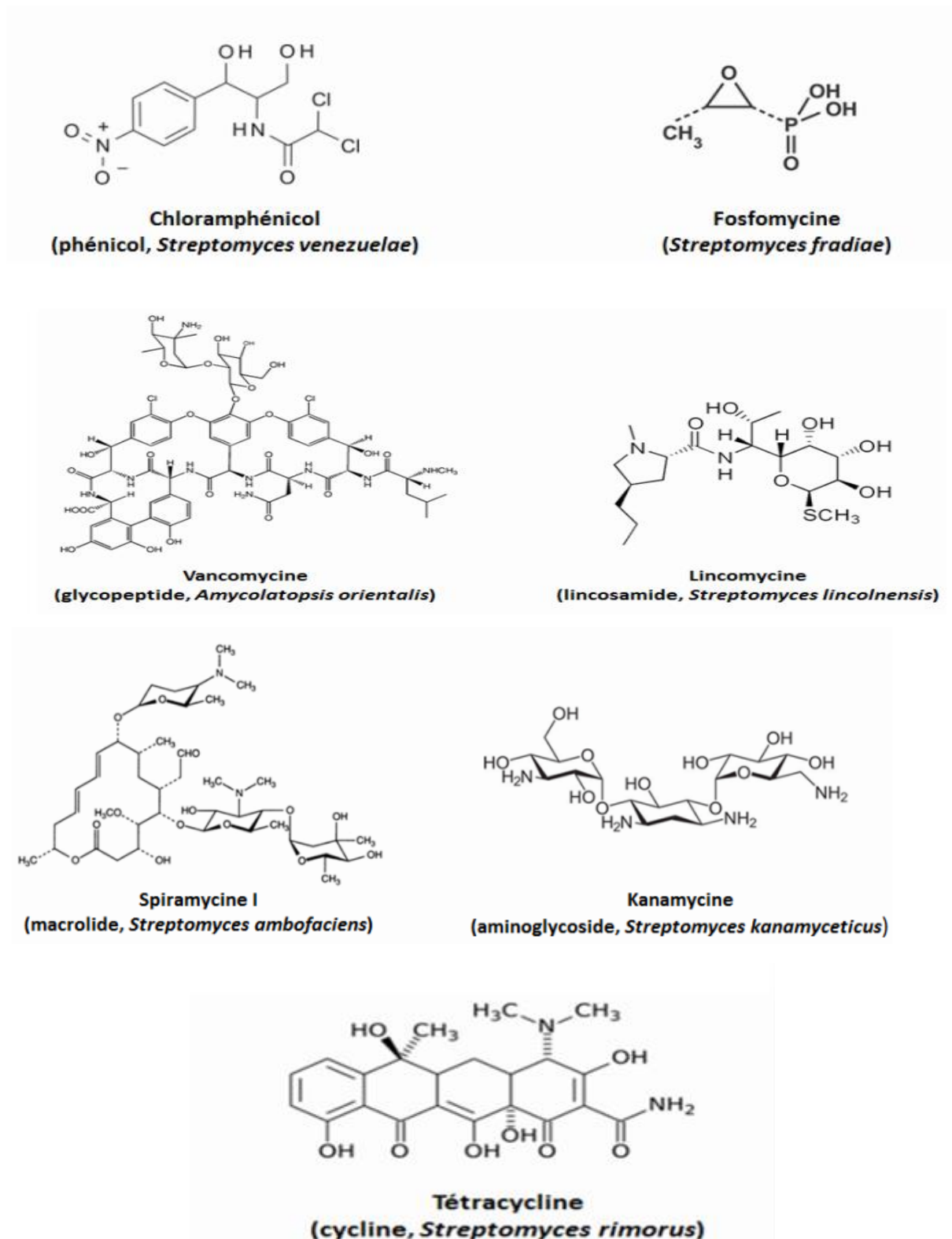


Figure 10 - Exemple de structure de différentes classes d'antibiotiques produits par *Streptomyces*. (HAAS,2015)

II.3.1.2.2 Antifongiques produits par le genre *Streptomyces*

Le mot antifongique réfère à un composé capable de tuer ou d'inhiber la croissance d'un champignon (HAAS,2015). Parmi les antifongiques naturels, plus de la moitié présentent en plus une activité antibactérienne. En fonction de la nature des molécules antifongiques, deux groupes sont ainsi distingués : les antifongiques à structure polyénique (actifs principalement contre les champignons) et les antifongiques à structure non polyénique (ayant souvent une activité antibactérienne en plus). (BERDY, 2005)

La structure des antifongiques polyéniques est caractérisée par la présence d'un grand cycle lactone possédant une partie hydrophile et une partie du squelette carboné hydrophobe ayant entre trois et sept doubles liaisons conjuguées (BRAUTASET *et al.*, 2000). Ils font partie de la famille des lactones macrocycliques et la plupart de ces molécules sont produites par des souches de *Streptomyces*. Parmi eux l'amphotéricine B, de la nystatine et de l'eurocidine (WATVE *et al.*, 2001). Malgré leur efficacité, les antifongiques polyéniques trouvent des limitations d'applications en thérapeutique vue leur toxicité vis-à-vis des cellules hôtes. Ces effets indésirables des polyènes sur les cellules eucaryotes des mammifères peuvent s'expliquer par l'interaction de ces agents avec le cholestérol. (YILMA *et al.*, 2007) Actuellement, l'attention est de plus en plus orientée vers la recherche de molécules antifongiques non polyéniques ayant comme sites d'action des cibles (SMAOUI,2010) qui possèdent des structures chimiques très variées. Ainsi, ils peuvent appartenir aux glucides telle que la kasugamycine, aux quinones comme les nanaomycines, aux polypeptides telle que la cyclosporine A, aux hétérocycles azotés comme les polyoxines, aux polyéthers telle que la nonensine, aux composés alicycliques telle que le cycloheximide et aux composés aromatiques comme c'est le cas de la griséofulvine. (AGHIGHI *et al.*,2004)

Globalement, on distingue deux types de macrolides non polyéniques :

- Les macrolides non polyéniques à activité antibactérienne. Leur première utilisation en médecine remonte à 1952, lorsque l'érythromycine a été découverte. (VARA *et al.*, 1989). Ils sont un groupe d'antibiotiques qui sont principalement actifs contre les bactéries Gram+, est actuellement largement utilisé dans les hôpitaux pour traiter les infections microbiennes. (OLANO *et al.*, 1998)
- Les macrolides non polyénique avec une activité antifongique majeure. De plus, ces derniers peuvent également avoir une activité antibactérienne contre les bactéries Gram-positives. Cette molécule a été utilisée en médecine, notamment en agriculture,

qui est de plus en plus utilisée pour lutter contre les phytopathogènes responsables des maladies cryptogamiques. (SMAOUI,2010)

II.4 Importance du genre *Streptomyces*

La diversité des métabolites secondaires produits par *Streptomyces* offre un énorme potentiel pour inhiber la croissance ou même tuer d'autres organismes tels que des champignons, des bactéries ou même des nématodes. Elles sont donc connues pour leur capacité à être des agents de biocontrôle (SAMAC *et al.*, 2003). Par conséquent, l'étude systématique des espèces *Streptomyces* devient de plus en plus importante étant donné qu'elles sont déjà une source avérée de composés médicalement utiles aux structures diverses et qu'elles ont le potentiel de produire encore plus de métabolites secondaires que ce qui a été isolé d'elles à ce jour. (HWANG *et al.*,2014)

Comme nous le savons, le *Streptomyces* est le plus grand genre d'actinobactéries qui sont connus pour leurs capacités métaboliques, qui produisent des milliers d'antibiotiques. Ils semblent être de bons candidats comme agents de lutte biologique. (AOUAR *et al.*, 2019)

II.4.1 Importance dans domaine médical

D'un point de vue écologique et médical, les *Streptomyces* sont très importantes et sont les micro-organismes les plus recherchés car ils peuvent produire de nombreux métabolites primaires et secondaires essentiels pour la santé comme les antibiotiques. Le sol constitue l'habitat naturel de la plupart de ces micro-organismes et ils peuvent représenter 1 à 20 % de la microflore cultivable. En fait, l'odeur du sol humide est en grande partie due aux substances volatiles produites par *Streptomyces*, telles que la géosmine (*ge*, terre ; *osme*, odeur). Ces micro-organismes jouent un rôle majeur dans la minéralisation. Ils sont très souples en nutrition et peuvent dégrader en aérobie des substances résistantes telles que la gomme, la lignine, la chitine, la kératine, le latex et les composés aromatiques. Les *Streptomyces* sont bien connues pour le grand nombre d'antibiotiques qu'ils synthétisent. Certains d'entre eux peuvent être utilisés dans la recherche médicale et biologique, comme la néomycine, la streptomycine, la tétracycline. (ZOUAGHI,2007)

De plus, les mycoses sont des maladies provoquées par des champignons microscopiques qui touchent l'être humain. Ils sont à l'origine de plusieurs infections qui peuvent être soit superficielles, sous-cutanées ou encore systémiques, Jusqu'à nos jours, les antifongiques les plus utilisés pour le traitement des mycoses sont des molécules macrolides

polyéniques comme l'amphotéricine B. Cette dernière, secrétée par *Streptomyces nodosus* (SMAOUI,2010), C'est un puissant antifongique qui inhibe la plupart des espèces pathogènes. En médecine humaine, l'amphotéricine B est le seul polyène antifongique qui peut être administré par voie intraveineuse pour l'élimination des mycoses profondes. (BOUAZIZ, 2018)

Plusieurs autres molécules naturelles, à part l'amphotéricine B et la nystatine, de la même classe des polyènes ont été découvertes dans les années 50. Il s'agit de la candidine, la candidine, l'étruscomycine (ou lucensomycine), la filipine, la natamycine (pimaricine ou tennecéline) et la trichomycine (hachimycine). La mépartricine a été commercialisée au début des années 70. Tous ces agents ont été utilisés pour le traitement des mycoses humaines. (BOUAZIZ, 2018)

II.4.2 Importance dans domaine biotechnologie industrielle

Les actinobactéries produisent de nombreuses molécules bioactives et des antibiotiques qui occupent une place importante dans l'arsenal thérapeutique et commerciale dans les domaines pharmaceutiques, médical et vétérinaires, et qui ont des effets cliniques divers contre de nombreux types de maladies (BOUAZIZ, 2018). Et plus de 70% des molécules bioactives d'origine Actinomycetale sont synthétisées par le genre *Streptomyces*, dont différentes familles chimiques telles que aminoglycosides, anthracyclines, chloramphénicol, β - lactames, macrolides et tétracyclines (ANANSIRIWATTANA *et al.*, 2006). Plus de 60% des substances médicamenteuses utilisées en chimiothérapie cancéreuse dérivent de composés naturels et la plupart proviennent d'actinobactéries, tels que l'actinomycine D. (ANIBOU *et al.*, 2008)

La différenciation morphologique des *Streptomyces* est accompagnée d'une différenciation métabolique. En effet, en milieu liquide et à la fin du cycle biologique, 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 *Streptomyces* produisent essentiellement la moitié des antibiotiques connus et plus de 70 % des antibiotiques produits industriellement. Cette diversité considérable de composés biologiquement actifs a pour conséquence la grande importance des *Streptomyces* dans l'industrie pharmaceutique puisque les molécules produites par fermentation sont la deuxième source de revenus de l'industrie biotechnologique après la brasserie (THOMSON *et al.*, 2004). Ces bactéries sont considérées comme le paradigme des microorganismes capables

de synthétiser des molécules naturelles par le biais de leur métabolisme secondaire. L'espoir que ces bactéries soient à nouveau une source majeure de découverte de nouveaux composés utiles est apparu suite au séquençage des génomes de plusieurs *Streptomyces* (BENTLEY *et al.*, 2002 ; IKEDA *et al.*, 2003). En effet, l'analyse fonctionnelle des gènes a révélé que les prédispositions génétiques de ces microorganismes à produire des métabolites secondaires étaient très sous-estimées. Ces bactéries possèdent en réalité un grand nombre de métabolites « cachés » ou « cryptiques ». Si on arrive à induire la production de ces métabolites cryptiques, il serait possible d'obtenir plusieurs nouvelles molécules d'intérêts thérapeutique et industriel.(SMAOUI,2010)

Compte tenu de l'importance médicale et industrielle des antibiotiques depuis une quarantaine d'années et de la place des actinobactéries et principalement les *Streptomyces* dans la production de ces molécules, l'intérêt des applications industrielles de ce groupe microbien est évident. (ZOUAGHI,2000)

II.4.3 Importance dans domaine agriculture

Les champignons phytopathogènes réduisent de façon importante la productivité des cultures dans le monde entier, causant des pertes économiques importantes. La fusariose est l'une des maladies fongiques s'attaque à plusieurs cultures telles que les lentilles, le palmier dattier et le pois chiches, d'autres champignons s'attaquent aux cultures, tels que *Botrytis fabae*, *Botrytis cinerea*, *Drechslera*, *Bipolaris* et *Verticillium dahliae*. En effet, plusieurs espèces de *Streptomyces* ont été utilisées pour lutter contre les phytopathogènes. Parmi Ces agents de biocontrôle *Streptomyces griseus LacI* pour sa capacité à inhiber in vitro des champignons et des bactéries phytopathogènes et aussi de contrôler la gale commune sur des plantules de radis. En plus, elle présente une activité antimicrobienne à large spectre (antifongique, anti Gram-positif et anti Gram-négatif) (AOUAR *et al.*, 2019). Ainsi, le genre *Streptomyces* a fait l'objet de nombreuses recherches comme antagoniste, parmi eux l'utilisation des agents biocontrôle de *Streptomyces palmae PC 12* qui possède un fort potentiel d'inhibition de la croissance du *Pyricularia sp.* (CHAIHARN *et al.*,2020)

D'autre part, l'utilisation excessive de fongicides chimiques en agriculture a entraîné une détérioration de la santé humaine, une pollution de l'environnement et le développement d'une résistance des agents pathogènes aux fongicides. En effet *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) et *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) provoquent respectivement l'antracnose et la brûlure des feuilles ou la pourriture des tiges dans une grande variété de cultures

agricoles avec l'activité antagoniste des *Streptomyces* vis-à-vis des champignons pathogènes est généralement liée à la production de composés antifongiques et d'enzymes hydrolytiques extracellulaires, la chitinase et la β -1,3-glucanase sont considérées comme des enzymes hydrolytiques importantes dans la lyse des parois cellulaires fongiques (PRAPAGDEE *et al.*, 2008).

Chapitre 3



III. Chapitre 3 – Métabolites secondaires de *Streptomyces*

III.1 Biosynthèse de métabolites secondaires

Deux grandes classes de métabolites secondaires produites par les espèces de *Streptomyces* sont les polykétides et les peptides non ribosomiques, qui ont une grande variété de fonctions structurelles et physiologiques. La biosynthèse des polykétides partage des mécanismes communs avec la biosynthèse des acides gras. En outre, la modification structurelle des métabolites secondaires, y compris la glycosylation, l'amination et la méthylation, qui a lieu après la synthèse du squelette polykétide, est une autre caractéristique biochimique unique de la biosynthèse des métabolites secondaires (HWANG *et al.*, 2014). La polykétide synthase (PKS) est un complexe enzymatique qui produit des métabolites secondaires, qui peuvent être divisés en trois catégories selon sa structure et sa fonction. Deux d'entre eux (type I et type II) se trouvent dans les micro-organismes, et le type III PKS se trouve également dans les espèces *Streptomyces*, mais principalement dans les plantes. La PKS de type II est un complexe de protéines monofonctionnelles uniques qui produisent des polycétides aromatiques (par exemple, la tétracycline et l'actinomycine) (YU *et al.*, 2012). Tandis que, Les synthétases de peptides non ribosomiques (NRPS) sont également des enzymes multimodulaires et multifonctionnelles, biosynthétisent des antibiotiques qui contiennent un ou plusieurs acides aminés-D. (SCHWARZER *et al.*, 2003)

III.2 Production de métabolites secondaires

La production microbienne de métabolites secondaires est généralement affectée et liée au métabolisme primaire de la souche productrice. Les métabolites intermédiaires en fin de métabolisme primaire servent de précurseurs pour la biosynthèse de ces métabolites secondaires bioactifs. En effet, la composition du milieu de culture influence les capacités métaboliques de l'organisme producteur ainsi que la biosynthèse de métabolites secondaires. Afin de découvrir de nouveaux composés ayant une bonne activité biologique, plusieurs méthodes coûteuses ont été utilisées, telles que le criblage de différentes sources biologiques spécifiques pour trouver de nouveaux micro-organismes de production (MELLOULI *et al.*, 2003 ; MIAO *et al.*, 2006 ; YU *et al.*, 2008). Alternativement, une méthode pour optimiser efficacement les conditions de production de biomolécules à partir de souches sélectionnées peut être réalisée en rechercher et analyser les conditions physiques et chimiques de la culture et la composition du milieu de croissance et de production. Il y a couramment une étroite relation entre le taux de croissance et le rendement maximal des métabolites secondaires

biologiquement actifs. Le rendement en composés biologiquement actifs augmente généralement avec l'optimisation des facteurs chimiques (composition du milieu, précurseurs, inhibiteurs, oligo-éléments, etc.) et physiques (température, pH, aération, etc.) de la croissance microbienne. (SMAOUI,2010)

Streptomyces est le meilleur candidat pour la production de métabolites secondaires biologiquement actifs. En effet, ce genre de bactéries est à l'origine d'environ 70 % des molécules antibiotiques utilisées en médecine et de 60 % des agents antifongiques utilisés en agriculture. (SUJATHA *et al.*, 2005). Plusieurs études ont été menées pour augmenter les métabolites d'intérêt produits à partir de ce genre de bactéries. L'importance et la signification principales de l'influence des conditions de culture des bactéries productrices sur la production des métabolites requis ont été prouvées. (SMAOUI,2010)

III.3 Etude des antibiotiques

III.3.1 Mise en évidence de l'activité antagoniste

L'activité antimicrobienne des actinobactéries est mise en évidence par la méthode des stries croisées (**Figure 11**) contre divers microorganismes. L'isolat d'actinobactéries est ensemencé sur milieu solide ISP2 en un seul trait en bordure de la boîte de Pétri. Cette dernière est incubée à une température de 30°C pendant 10 jours pour permettre à l'actinobactéries de croître et de sécréter ses antibiotiques. Par la suite, les microorganismes-cibles sont ensemencés en traits perpendiculaires à la culture de l'actinobactéries. (AOUICHE,2013)

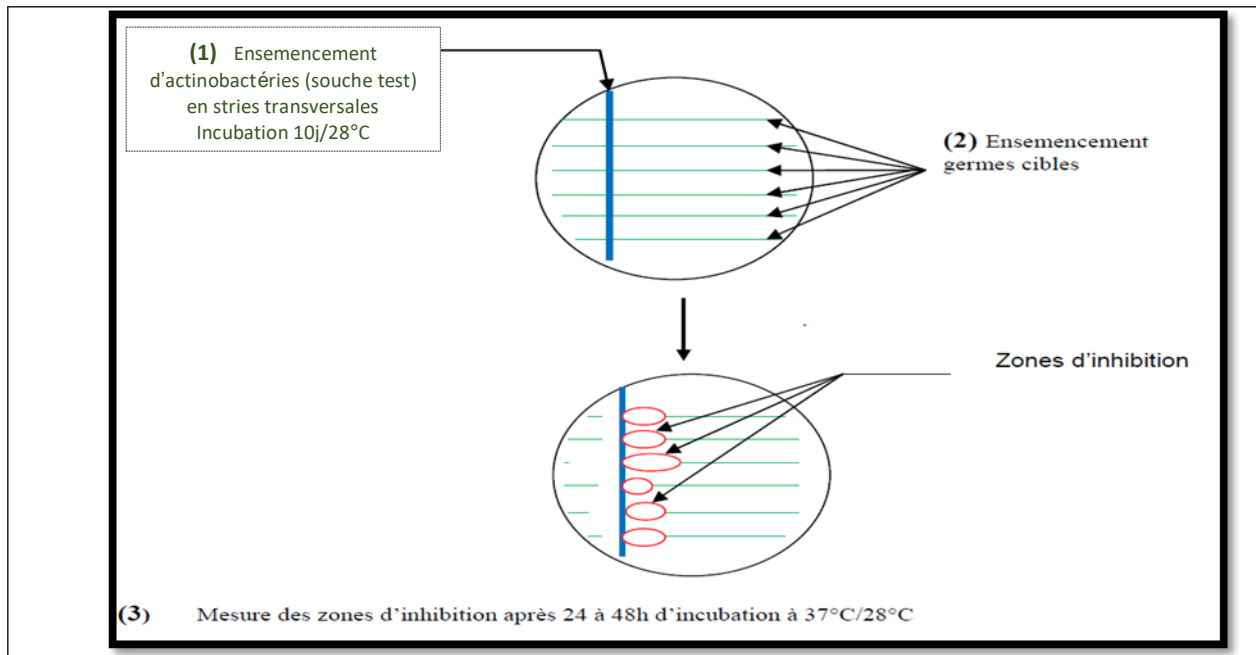
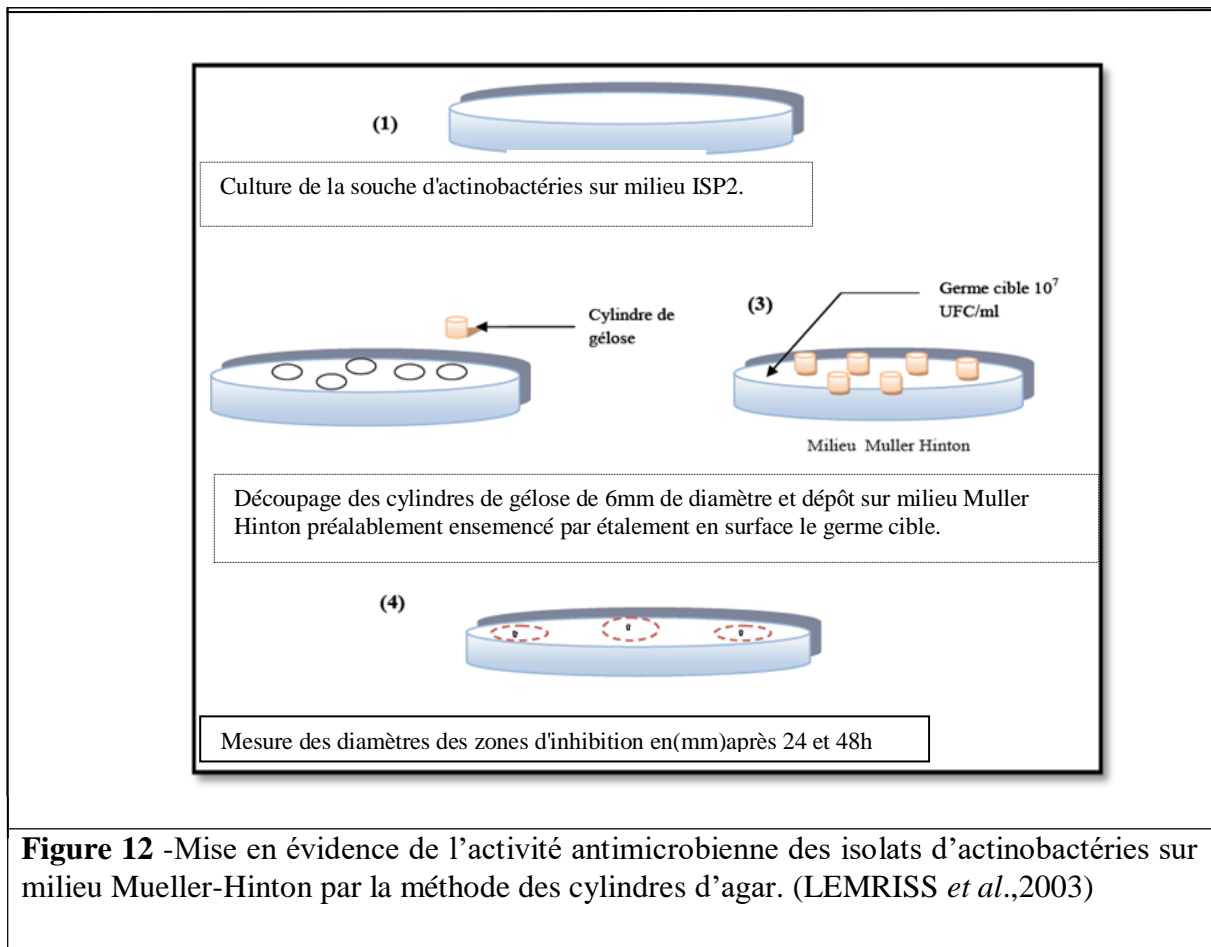


Figure 11-Mise en évidence de l'activité antimicrobienne sur milieu ISP2 solide par la méthode des stries croisées (BOUBETRA *et al.*, 2013).

La lecture des résultats se fait après 24 h (pour les bactéries et les levures) et 36 h (pour les champignons filamenteux) en mesurant les zones d'inhibition (en millimètre) entre la bordure de l'actinobactéries et celle du microorganisme-cible. (AOUICHE,2013)

De plus, la mise en évidence de l'activité antibactérienne des isolats d'actinobactéries a été également réalisée par la méthode des cylindres d'agar sur milieu Mueller-Hinton. Cette méthode consiste à ensemencer les isolats d'actinobactéries en stries très serrées à l'aide d'une anse stérile et d'une manière homogène à la surface du milieu ISP2. Les boîtes sont incubées à $28 \pm 2^\circ\text{C}$ pendant 14 jours (MEKLAT, 2012). Après incubation, des cylindres de gélose de 6 mm de diamètre sont découpés aseptiquement à l'aide d'un emporte-pièce puis déposés à la surface du milieu Mueller-Hinton, préalablement ensemencé par le germe cible (DJINNI, 2009). Les isolats d'actinobactéries libèrent leurs métabolites secondaires dans le milieu au cours de leur croissance. Les boîtes ensemencées sont maintenues à 4°C pendant 2h avant d'être incubées à 37°C . Les zones d'inhibition sont mesurées après 24 h d'incubation à 37°C . La **Figure 12** illustre les étapes de la méthode.(HARIR,2018)



III.3.2 Production des antibiotiques

Les antibiotiques sont produits par un large éventail de micro-organismes fongiques et de bactéries, et inhibent ou tuent d'autres micro-organismes à de faibles concentrations. Un grand nombre d'antibiotiques ont été identifiés dans les milieux naturels, mais moins de 1 % d'entre eux sont utiles sur le plan médical. De nombreux antibiotiques ont été modifiés structurellement en laboratoire pour augmenter leur efficacité, formant ainsi la classe des antibiotiques semi-synthétiques. (HARIR,2018)

Soumise à un contrôle très strict, la production des antibiotiques par des micro-organismes non génétiquement modifiés est toujours très faible. Très tôt, des programmes d'amélioration de la production par modification des souches ont été mis en œuvre. Ces programmes ont fait d'abord appel à la mutagenèse aléatoire. De nombreux progrès ont été réalisés : élucidation des voies métaboliques de synthèse des antibiotiques et des régulations de ces voies, étude des gènes impliqués, compréhension des mécanismes de résistance des

souches aux antibiotiques qu'elles produisent, etc. Avec le développement du génie métabolique et du génie génétique, ces progrès permettent actuellement des modifications génétiques mieux ciblées. Les techniques récentes d'évolution moléculaire dirigée permettent même d'envisager la production de nouveaux antibiotiques hybrides par recombinaison de gènes entre diverses souches productrices. (HARIR,2018)

Au cours de la fermentation, le milieu de production doit d'abord permettre d'assurer une importante croissance pour conduire à une concentration élevée en cellule au moment de la production. Il doit assurer ensuite la maintenance de la vitalité des cellules et la production optimisée de l'antibiotique. Il doit de ce fait fournir des sources d'énergie et assurer les conditions physico-chimiques désirées (pH, température, source de carbone, source d'azote). Les milieux doivent permettre de fournir sans limitation les précurseurs nécessaires aux synthèses des antibiotiques tout en évitant les phénomènes de répression et/ou d'inhibition. (BOUBETRA,2013)

III.3.2.1 Effet de la composition du milieu de culture

La nature et la concentration de certains composés dans le milieu de culture ont un effet éminent sur la production des métabolites secondaires biologiquement actifs. En fait, les travaux de Gesheva et al., 2005 ont montré que la nature de la source : carbone, azote, phosphore, potassium, magnésium et oligo-éléments (principalement Mn^{2+} , Cu^{2+} et Fe^{2+}), affectent fortement la production de la molécule antifongique de type macrolide non polyénique, la AK-111-81, par *Streptomyces hygroscopicus*. De plus, Mellouli et al., 2003 ont constaté que la production de deux biomolécules actives en 2003: les dérivés de DKP Cyclo (L-Phe, L-Pro) et la production de molécules 3-indo-éthanol à partir de nouvelles bactéries du genre *Streptomyces* est étroitement liée à la nature de la source de carbone. Egalement, l'origine d'une même source de carbone peut affecter la sécrétion des biomolécules par le microorganisme producteur. C'est le cas de l'antibiotique aminoglycoside, la néomycine. Il a été démontré par Adinarayana et al., 2003, que la production de cette molécule par la souche *Streptomyces marinensis* est fonction de l'origine céréalière de l'amidon utilisé comme source de carbone. (SMAOUI,2010)

a. Influence de la source de carbone, d'azote : Le choix de la source de carbone utilisée par les microorganismes à une grande influence sur la croissance bactérienne et la production de molécules actives (DOULL et VINING, 1990 ; SPIZEK et TICHY, 1995). Siddique *et al.*, (2013) ont prouvé que la croissance de *Streptomyces avermitilis* 41445 et la

production d'ivermectine B1b sont affectées par le taux de métabolisme de la source de carbone. La dégradation rapide du glucose entraîne une diminution du rendement, et l'amidon est un bon élément pour Étudier la croissance des souches. D'autre part, la production d'antibiotiques est directement liée à la nature et à la concentration de la source d'azote. En effet, les ions ammonium ont un impact négatif sur la production d'antibiotiques. Ces ions inhibent la formation de précurseurs dans de nombreux cas. (OMURA *et al.*, 1984 ; TANAKA *et al.*, 1986)

b. Influence de la source de phosphate : L'effet du phosphate inorganique sur la physiologie de *Streptomyces* et la production d'antibiotiques est connu depuis longtemps (SANTOS-BENEIT, 2015). De manière générale, il a été observé que des concentrations élevées de phosphate (supérieures à 10 mm) dans le milieu de culture peuvent conduire à une diminution de la production d'antibiotiques (MARTIN, 1989). A l'inverse, de faibles taux de phosphate (inférieurs à 0,1 mm) initient la transition vers la production de mycélium aérien (TENCONI *et al.*, 2012), ce qui conduit également à la production de métabolites secondaires. (RODRIGUEZ-GARCIA *et al.*, 2007)

III.3.2.2 Effet du pH, de la température, de l'agitation et du temps d'incubation

Les conditions de culture comme le pH, la température, l'agitation et le temps d'incubation, affectent énormément la production des métabolites secondaires. Depuis longtemps, il a été démontré l'influence du pH sur la production de plusieurs métabolites organiques du métabolisme secondaire. En effet, depuis 1973, Iwai *et al.*, ont montré que la production, par le champignon *Cephalosporium caeruleus*, de la cerulenine qui est une petite molécule inhibitrice du métabolisme cellulaire du cholestérol et des lipides est affectée par la variation du pH du milieu de culture. Cette observation a été constatée lors de la production de plusieurs métabolites secondaires à savoir la production d'un antifongique par la souche *Streptomyces rochei* AK39. La production de cet antifongique peut être stimulée ou inhibée par des variations de pH. (AUGETUSTINE *et al.*, 2005)

Concernant la température, la souche marine *Streptomyces* BT-408 possède une gamme assez large de température de croissance, entre 20 et 40°C avec un optimum à 30°C. La gamme correspondante pour la production de l'antibiotique polykétide SBR-22 est beaucoup plus étroite et varie entre 25 et 33°C (SUJATHA *et al.*, 2005). L'optimum de production est obtenu à 30°C qui correspond à la température optimale de croissance. Dans ces cas,

l'accroissement de la température d'incubation de 25 à 30°C fait augmenter la croissance des cellules et la production du métabolite. (SMAOUI,2010)

L'agitation affecte l'aération et le mélange des éléments nutritifs dans le milieu de fermentation et par conséquent la production de métabolites secondaires. Selon MELLOULI *et al.*, en 2004, il a été rapporté que pour la souche *Streptomyces* TN58 produisant cinq molécules biologiquement actives différentes, la meilleure production 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 énormément. (SMAOUI,2010)

Chez *Streptomyces*, l'évolution des métabolites secondaires dans le temps (ce qui est un facteur déterminant) varie d'une espèce à l'autre. En effet, pour la souche *Streptomyces* TN58, la production de biomolécules démarre après 60 heures d'incubation et atteint un maximum après 72 heures. Elle est restée stable en 80 heures, puis a progressivement diminué de 120 heures pour disparaître (MELLOULI *et al.*, 2004). Cependant, pour la souche *Streptomyces rochei* AK39 qui produit des métabolites antifongiques, elle commence à produire après 4 jours de culture et atteint une valeur maximale après 8 jours. (AUGUSTINE *et al.*, 2005)

III.4 Méthodes d'extraction des métabolites secondaires

L'étude des métabolites microbiens commence généralement par la collecte d'échantillons de sol. Une grande variété d'environnements (par exemple, des sols de composition inhabituelle ou provenant de différentes zones climatiques) peut être explorée pour rechercher de nouvelles souches. L'échantillon prélevé est généralement préparé sous forme de suspension dans l'eau, et des dilutions appropriées du surnageant sont étalées sur un milieu solide (agar). (SEIDEL,2006)

L'extraction de la substance antimicrobienne à partir des filtrats de culture est réalisée à l'aide de divers solvants organiques. Pour cela, chaque souche d'actinobactérie est ensemencée dans deux erlenmeyers de 500 mL, contenant chacun 100 mL de milieu ISP2 liquide (pH = 7,2 ; sous agitation à 250 rpm. Les erlenmeyers sont incubés à 28± 2°C). (HARIR,2018)

Après une production optimale d'antibiotiques, les filtrats ont été répartis en 4 fractions de 50 mL, ces filtrats sont mélangés chacun avec un même volume de chacun des quatre solvants

choisis, le n-hexane, le dichlorométhane, le n-butanol et l'acétate d'éthyle : mélanger dans une ampoule à décanter (V/V) pour obtenir les phases aqueuses et organiques. (HARIR,2018)

Afin de déterminer lequel des solvants permet une meilleure extraction d'antibiotiques (quantité importante), les phases organiques et les phases aqueuses sont récupérées puis déshydratées par passage à travers un papier filtre (**Whatman n° 1**) contenant du sulfate de sodium anhydre (Entonnoir + papier filtre + 2 g de sulfate de sodium) afin d'éliminer les traces d'eau résiduelles et les contaminants hydrophiles présents. Les extraits des différentes phases organiques et aqueuses sont concentrés à sec à l'aide d'un évaporateur rotatif sous vide (40 °C) puis repris dans 1mL de méthanol. Ces extraits sont testés pour leur activité par la méthode des puits ou des disques de papier de diamètre de 06 mm (antibiographie). (HARIR,2018)

Tableau 05 : Propriétés physicochimiques des solvants utilisés dans l'extraction des métabolites secondaires. (SEIDEL, 2006)

Solvant	Index de Polarité	Point d'ébullition (C°)	Viscosité (cPoise)	Solubilité dans L'eau (% w/w)
<i>n-Hexane</i>	0.0	69	0.33	0.001
<i>Dichlorométhane</i>	3.1	41	0.44	1.6
<i>n-Butanol</i>	3.9	118	2.98	7.81
<i>iso-propanol</i>	3.9	82	2.30	100
<i>n-Propanol</i>	4.0	92	2.27	100
<i>Chloroforme</i>	4.1	61	0.57	0.815
<i>Ethyleacétate</i>	4.4	77	0.45	8.7
<i>Acétone</i>	5.1	56	0.32	100
<i>Méthanol</i>	5.1	65	0.60	100
<i>Éthanol</i>	5.2	78	1.20	100

III.4.1 Choix de meilleur solvant d'extraction

Pour sélectionner le meilleur solvant d'extraction de la substance antimicrobienne, les extraits obtenus à partir des filtrats de culture ont été testés contre les microorganismes-cibles choisis : *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). La lecture des résultats a été effectuée après 24 h d'incubation à $28 \pm 2^\circ\text{C}$. Elle consiste à déterminer le diamètre de la zone d'inhibition autour du disque. Le solvant permettant d'obtenir le diamètre d'inhibition le plus élevé est considéré comme le meilleur solvant d'extraction. (AOUICHE et al.,2015)

III.4.2 Purification et Caractérisation métabolites secondaires

Les techniques de purification utilisées sont diverses et variées et dépendent de la nature des métabolites isolées. On peut citer à titre d'exemple l'extraction liquide/liquide ou liquide / solide, la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide (à basse ou à haute pression). Les techniques chromatographiques sont très puissantes par la diversité des supports de séparation mise sur le marché. Ces techniques peuvent être utilisées en semi-préparative ou en préparative selon les besoins. Une fois les produits séparés, les analyses spectrales permettent de rassembler les données nécessaires pour établir les structures chimiques. Parmi ces analyses spectrales on peut citer l'infra-rouge (IR), le spectre de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire. (AWAD,2005)

Il permet de comparer rapidement et simultanément des dizaines d'échantillons dans des conditions bon marché, avec d'autres techniques couramment utilisées dans le domaine des produits naturels (PRADEAU et DAUPHIN., 2002). Presque toutes les publications relatives à la séparation des produits d'origine microbienne rapportent le rapport frontal (Rf) comme caractéristique des molécules purifiées. L'illumination est simple, la première consiste à la visualiser sous lumière ultraviolette (254 et 366 nm) (ARASU *et al.*, 2009). Il faut bien noter que la visualisation par UV est non- destructive, si les molécules n'apparaissent pas sous UV il est indispensable de passer par la pulvérisation des réactifs (révélateurs). (GIBBONS, 2006)

III.4.2.1 Purification

A l'échelle industrielle, lors d'une production naturelle à partir de microorganismes, les métabolites secondaires biologiquement actifs sont produits dans des immenses cuves appelées fermenteurs, qui peuvent contenir des milliers de litres d'un milieu de culture favorable à la croissance du microorganisme producteur de ou des molécules recherchées. Généralement les milieux de production utilisés pour la préparation naturelle de métabolites secondaires biologiquement actifs sont complexes. Ces milieux peuvent devenir encore

chargés vu que le microorganisme producteur peut sécréter plusieurs autres métabolites outre la ou les molécule(s) recherchée(s). L'extraction et la séparation de ces molécules d'intérêts du jus de fermentation, constituent une étape délicate et souvent tributaire de leurs caractéristiques. (SMAOUI,2010)

En général, la technique consiste à séparer par centrifugation la biomasse du jus de fermentation contenant les molécules d'intérêts. Par ailleurs, il est à noter que dans des cas assez rares, certaines molécules ne sont pas secrétées en totalité dans le surnageant et une fraction reste intracellulaire. Dans cette situation il faut traiter la biomasse par des moyens physiques. L'extraction et la purification des molécules actives du jus de fermentation nécessitent l'application de plusieurs techniques chimiques et physico-chimiques. Cependant, bien que la technique utilisée pour l'extraction et la purification des molécules bioactives soit assez général, quelques étapes doivent être adaptés selon la nature de la molécule d'intérêt. (SMAOUI,2010)

III.4.2.2 Caractérisation

Après obtention de la molécule active à l'état pur et pour élucider sa structure chimique, il est nécessaire d'appliquer plusieurs techniques spectroscopiques. Le nombre de techniques à utiliser dépend de la nature de la molécule à savoir sa masse, sa géométrie dans l'espace, sa polarité, etc. L'élucidation structurale des molécules organiques ayant des activités biologiques telles que les antibiotiques sont faits à l'aide de mesures de susceptibilité magnétique, des techniques spectroscopiques (UV-visible, Infrarouge ou Résonance Paramagnétique Electronique...). Ces techniques sont complémentaires et généralement l'élucidation de la structure chimique de la molécule recherchée est obtenue par la combinaison de leurs résultats. Les spectres UV qui fournissent généralement moins de renseignements sur la structure moléculaire des composés comparés aux spectres RMN et IR, sont utilisés soit pour une confirmation soit pour une identification grâce à des règles empiriques et à la comparaison avec des spectres de références. (SMAOUI,2010)

Conclusion



Conclusion

L'objectif principal de la présente synthèse bibliographique est de montrer l'importance de genre *Streptomyces* dans la découverte de nouveaux composés bioactifs ayant des propriétés antimicrobiennes combattre contre des agents pathogènes humains et végétaux. Comme nous l'avons trouvé le *Streptomyces* présente le genre plus dominant d'actinobactéries. Bien que le sol considère comme source essentiel pour l'isolement des *Streptomyces* avec un potentiel diversifié. Et ce travail peut être un support bibliographique utile pour les chercheurs qui souhaitent étudier *Streptomyces*.

La première partie a porté une idée générale sur le genre *Streptomyces*, par déterminer les aspects du cycle de développement, défini méthode de la germination et sporulation qui se caractérisent par la formation d'un mycélium à substrat non fragmenté (MS) et d'un mycélium aérien (MA), reconstruction complète de la cellule et des changements morphologiques. D'un point de vue génétique, le génome de *Streptomyces* présente niveaux élevés de guanine et de cytosine. La structure de milieu de culture de *Streptomyces* sa croissance et sa production optimale d'antibiotiques et leur classification nécessitent des nutriments.

Dans la deuxième partie, consacré sur les méthodes d'isolement d'actinobactéries « *Streptomyces* » citant les étapes approuvées pour l'identification de l'espèce se faisait en combinant l'observation microscopique, macroscopique, physiologique, chimique avec les analyses moléculaires. Également en citant la bioactivité de *Streptomyces* et leur capacité de produire des métabolites secondaires comme source de substances avec différentes activités biologiques.

Dans la dernière partie, ont obtenu la biosynthèse et la production de métabolites secondaires à partir de *Streptomyces* et décrits les techniques d'extraction, purification et caractérisation des molécules actives produites par ce genre.

En perspective, avec la spécificité des actinobactéries qui produisent une énorme variété de molécules bioactives, ce serait de l'importance de compléter et d'exploiter ces données théoriques en réalisant des études sur le terrain avec des tests pratiques. Notamment la recherche de nouvelles souches de *Streptomyces* le principal fournisseur de nouveaux antibiotiques et antifongiques et de nombreuses molécules d'activité antimicrobienne.

*Références
bibliographiques*



Références bibliographiques

- ADINARAYANA K., ELLAIAH P., SRINIVASULU B., DEVI R.et ADINARAYANA G., 2003- *Repose surface methodological approach to optimize the nutritional parameters for neomycin production by Streptomyces marinensis under solid-state fermentation*. Process Biochemistry, Vol. 38(11) :1565-1572.
- AHMED A., ALI S., WEINBAUM D.et GOLDBERG E., 1996- *Streptomyces infection in AIDS presenting with pneumonia and monarthrititis*. Infectious Diseases in Clinical Practice, Vol.5(3) :207.
- AGHIGHI S., SHAHIDI BONJAR G., RAWASHDEH R., BATAYNEH S.et SAADOUN I.,2004- *First report of antifungal spectra of activity of Iranian actinomycetes strains against Alternaria solani, Alternaria alternate, Fusarium solani, Phytophthora megasperma, Verticillium dahliae and Saccharomyces cerevisiae*. Asian Journal of Plant Sciences, Vol. 3(4) :463-471.
- ALWASH M., IBRAHIM N. et AHMAD W.,2013- *Identification and mode of action of antibacterial components from Melastoma malabathricum Linn leaves*. American journal of infectious diseases, Vol. 9(2) : 46-58.
- ANANDAN R., DHARUMADURAI D., MANOGARAN G., 2016- *An Introduction to Actinobacteria*. In: Dhanasekaran D., Jiang Y. (eds) Actinobacteria: Basics and Biotechnological Applications. Intech, Rijeka, pp:3-37.
- ANANSIRIWATTANA W., TANASUPAWAT S., AMNUOYPOL S.et SUWANBORIRUX K.,2006- *Identification and antimicrobial activities of actinomycetes from soils in Samed Island, and geldanamycin from strain PC4-3*. Thai J Pharm Sci, Vol.30 : 49-56.
- ANDERSON A.et WELLINGTON E. et 2001- *The taxonomy of Streptomyces and related genera*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, Vol.51(3) : 797-814.
- ANGEBAULT C.et ANDREMONT A.,2013- *Antimicrobial agent exposure and the emergence and spread of resistant microorganisms : issues associated with study design*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. Vol.32 :581–595.

- ANIBOU M., CHAIT A., ZYAD A., TAOURIRT M., OUHDOUCH Y. et BENSHERREF A., 2008- *Actinomycetes from Moroccan habitats : isolation and screening for cytotoxic activities*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.24(10) :2019-2025.
- AOUICHE A., BOURAS N., MOKRANE S., ZITOUNI A., SCHUMANN P., SPRÖER C., SABAOU N. et KLENK H., 2015- *Actinokineospora mzabensis sp. nov., a novel actinomycete isolated from Saharan soil*. Antonie Van Leeuwenhoek, Vol.107(1):291-296.
- AOUICHE A., 2013- *Taxonomie et antibiotiques de quelques souches de Streptomyces et de Saccharothrix des sols de Ghardaïa actives contre des microorganismes pathogènes et toxigènes pour l'Homme*. Thèse de Doctorat. Microbiologie. L'ENS de Kouba Alger, 8p.
- AOUAR L., BOUKELLOUL I., BENADJILA A., MEDJOU DJ H. et ZAABAT M., 2019- *Streptomyces griseus lacI : biocontrôle et propriétés promotrices de la croissance des plantes*. Revue des bio ressources, Vol.9(1) : 11-11.
- ARASU M., DURAI PANDIYAN V., AGASTIAN P. et IGNACIMUTHU S., 2009- *In vitro antimicrobial activity of Streptomyces spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India)*. Journal de Mycologie Médicale, Vo.19(1) :22-28.
- AWAD G., 2005- *Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de nouveaux métabolites secondaires chez Aspergillus ochraceus non producteur de l'ochratoxine A*. Thèse de Doctorat. Génie des procédés., institut national polytechnique de Toulouse, 21p.
- AYARI A., MORAKCHI H. et DJAMILA K., 2012- *Identification and antifungal activity of Streptomyces sp. S72 isolated from Lake Oubeira sediments in North-East of Algeria*. African Journal of Biotechnology, Vol.11(2) :305-311.
- BALTZ R., 2007- *Antimicrobials from Actinomycetas : back to the future*. Microbe, Vol.2 :125-133.
- BECKER B., LECHEVALIER M., GORDON R. et LECHEVALIER H., 1964- *Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole-cell hydrolysates*. Applied microbiology, Vol.12(5) :421-423.
- BENTLEY S., CHATER K., CERDEÑO-TARRAGA A., CHALLIS G., THOMSON N., JAMES K. et HOPWOOD D., 2002- *Complete genome sequence of the model actinomycete Streptomyces coelicolor A3 (2)*. Nature, Vol.417(6885) :141-147.
- BÉRDY J., 2012- *Thoughts and facts about antibiotics : where we are now and where we are heading*. J Antibiot, Vol. 65 :385–395.

- BERDY J.,2005- *Bioactive microbial metabolites*. The Journal of antibiotics, Vol.58(1) :1-26.
- BOUAZIZ S., 2018- *Recherche de souches bactériennes locales productrices de substances antimicrobiennes : isolement, sélection, identification des souches actives et caractérisation partielle des substances bioactives*. Thèse de Doctorat. Sciences en Biologie., université Kasdi Merbah- Ouargla, 14p.
- BOUBETRA D., SABAOU N., ZITOUNI A., BIJANI C., LEBRIHI A., et MATHIEU F.,2013- *Taxonomy and chemical characterization of new antibiotics produced by Saccharothrix SA198 isolated from a Saharan soil*. Microbiological research, Vol.168(4) :223-230.
- BOUBETRA–BISKRI D., 2013-*Nouvelles espèces de Saccharothrix isolées des sols sahariens et nouveaux antibiotiques secrétés par Saccharothrix SP. SA198*. Thèse de Doctorat. Sciences Agronomiques. L'ENS de kouba,20p.
- BOUYAHYA A., EL MOUSSAOUI N., ABRINI J., BAKRI Y.et DAKKA N.,2016- *Determination of phenolic contents, antioxidant and antibacterial activities of strawberry tree (Arbutus unedo L.) leaf extracts*. Br Biotechnol J, Vol.14 :1–10.
- BRAUTASET T., SEKUROVA O., SLETTA H., ELLINGSEN T., STRØM A., VALLA S.et ZOTCHEV S., 2000- *Biosynthesis of the polyene antifungal antibiotic nystatin in Streptomyces noursei ATCC 11455 : analysis of the gene cluster and deduction of the biosynthetic pathway*. Chemistry & biology, 7(6) :395-403.
- CARON F.,1992- *Streptomyces sp as à cause of nodular pneumonia in à HIV infected patient ?* Med Microbiol Lett, Vol. 1 :297-303.
- CAREY J., MOTYL M. et PERLMAN D.,2001- *Catheter-related bacteremia due to Streptomyces in a patient receiving holistic infusions*. Emerging infectious diseases, Vol.7(6) :1043.
- CASTILLO U., STROBEL G., FORD E., HESS W., PORTER H., JENSEN J., ALBERT H., ROBISON R., CONDRON M., TEPLow D., STEVENS D.et YAVER D.,2002- *Munumbicins, wide-spectrum antibiotics produced by Streptomyces NRRL 30562, endophytic on Kennedia nigricans*. Microbiology, Vol.148 : 2675–2685.
- CHAIHARN M., THEANTANA T. et PATHOM-AREE W.,2020- *Evaluation of biocontrol activities of Streptomyces spp. Against rice blast disease fungi*. Pathogens, Vol.9(2) :126.

- CHATER K.,2006- *Streptomyces inside-out : a new perspective on the bacteria that provide us with antibiotics*. Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences, Vol.361(1469) :761-768.
- CHATER K.,1998-Taking a genetic scalpel to the Streptomyces colony. Microbiology, Vol.144(6) :1465-1478.
- CLAESSEN D., DE JONG W., DIJKHUIZEN L.et WÖSTEN H.,2006- Regulation of Streptomyces development : reach for the sky . Trends in microbiology, 14(7) :313-319.
- CLARKE P., WARNOCK G., BLOWERS R.et Wilkinson M.,1964- *Brain abscess due to Streptomyces griseus*. Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry, Vol.27(6) :553.
- DA SILVA I., MARTINS M., CARVALHO C., DE AZEVEDO J.et DE LIMA PROCOPIO R.,2012- *The effect of varying culture conditions on the production of antibiotics by Streptomyces spp. Isolated from the Amazonian Soil*. Ferment Technol, Vol.1(105) : 2.
- DEMAIN A.,2000- *Small bugs, big business : the economic power of the microbe*. Biotechnol Adv, Vol.18(6) : 499-514.
- DEKLEVA M.et STROHL W.,1988- *Biosynthesis of ϵ -rhodomycinone from glucose by Streptomyces C5 and comparison with intermediary metabolism of other polyketide-producing streptomycetes*. Canadian journal of microbiology, Vol.34(11) :1235-1240.
- DELAUNAY S., RONDAGS E.et GERMAIN P.,2003- *Production d'antibiotiques par biotechnologies. Techniques de l'ingénieur. Opérations unitaires, génie de la réaction chimique*. P : 1-12.
- DJINNI J.,2009- *Etude taxonomique de souches d'actinomycètes halophiles modérées productrices de substances antimicrobiennes isolées dans la région de Béjaia*. Thèse de Magister, spécialité : Microbiologie Appliquée. Université A. Mira, Bejaia, 46p.
- DOULL J.et VINING L. ,1990- *Physiologie of antibiotic production in actinomycetes and some control mechanisms*. Biotech. Adv, Vol.8 : 141-158.
- DUNNE E., BURMAN W.et WILSON M.,1998- *Streptomyces pneumonia in a patient with human immunodeficiency virus infection : case report and review of the literature on invasive Streptomyces infections*. Clinical infectious diseases, Vol.27(1) : 93-96.
- EKKELENKAMP M., DE JONG W., HUSTINX W.et THIJSSEN S.,2004-*Streptomyces thermovulgaris bacteremia in Crohn's disease patient*. Emerging infectious diseases, Vol.10(10) : 1883.

- EUZEBY J.,2009- *List of prokaryotic names with standing in nomenclature*. <http://www.bacterio. Cict. fr>.
- EUZEBY JP.,2002- Les taxons bactériens d'intérêt vétérinaire décrits en 2001. *Revue Méd. Vét.*, 153(1) :5-14.
- FAVRE E., FLEURIDAS G., BARIL L., CAUMES E., GUILBERT F.etBERTRAND J.,1998- *Streptomyces somaliensis mycetoma with craniofacial involvement*. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*, Vol.99(2) : 70-74.
- GESHEVA V., IVANOVA V., GESHEVA R.,2005- *Effects of nutrients on the production of AK-111-81 macrolide antibiotic by Streptomyces hygroscopicus*. *Microbiological research*,Vol. 160(3) :243-248.
- GOODFELLOW M., WHITMAN W., KÄMPFER P., BUSSE H., Trujillo M.,SUZUKI K., LUDWIG W.et WHITMAN W.,2012- *Phylum XXVI.Actinobacteria phyl. nov. In: Williams ST, Sharpe ME, Holt JG(eds) Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed, part A. Springer, New York,Vol.5 : 1–2024.
- GIBBONS S.,2006-*An Introduction to PlanarChromatography, Methods in Biotechnology*. Natural Products Isolation, 2nd ed, Vol. 20 : 77-116.
- GOOSSENS H., FERRECH M., VANDER STICHELE R., ELSEVIERS M.et ESAC Project Group.,2005- *Outpatient antibiotic use in Europe and association with resistance : a cross-national database study*. *The Lancet*, Vol.365(9459) : 579-587.
- GRUET M., MAYDAT L.et FERRO R.,1970- *Peritonitis due to S. somaliensis*. *Bulletin de la Societe medicale d'Afrique noire de langue francaise*, Vol.15(4) :609-610.
- GUGNANI H., UNAOGU I.et EMERUWA C.,1993- *Pulmonary infection due to Streptomyces griseus*. *Journal of communicable diseases*,Vol. 25(1) : 38-40.
- HAAS D.,2015-*Métabolisme secondaire de Streptomyces ambofaciens : exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane*. Thèse de Doctorat. École doctorale 426 : gènes génomes cellules., université Paris-sud, p :22.
- HAMED J., POORINMOHAMMAD N.et WINK J.,2017-*The role of actinobacteria in biotechnology*. In *Biology and biotechnology of actinobacteria*, P :269-328.
- HARDISSON C., MANZANAL M., SALAS J.et SUAREZ J.,1978-*Fine structure, physiology and biochemistry of arthrospore germination in Streptomyces antibioticus*. *J. Gen. Microbiol*, Vol.105:203–214.

- HARIR M., BENDIF H., BELLAHCENE M., FORTAS Z. et POGNI R., 2018- *Streptomyces secondary metabolites*. Basic Biology and Applications of actinobacteria, Vol. 6 :99-122.
- HARIR M., 2018- *Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactériés isolées des sols arides et semi arides d'Algérie*. Thèse de Doctorat. Biotechnologie., Université d'Oran 1 Ahmed Ben Bella, p :51.
- HARVEY A., 2000- *Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products*. Drug Discovery Today, Vol. 5 :294– 300.
- HOLT J., KRIEG N., SNEATH P., STALEY J., et WILLIAMS S., 1994- *Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th*. Baltimor : William & Wilkins, Vol. 107 : 59- 64.
- HOLTZ H., LAVERY D. et KAPILA R., 1985- *Actinomycetales infection in the acquired immunodeficiency syndrome*. Annals of internal medicine, Vol.102(2) :203-205.
- HOPWOOD D., 2007- *Streptomyces in Nature and Medicine : The Antibiotic Makers*. Oxford University Press.
- HWANG K., KIM H., CHARUSANTI P., PALSSON B. et LEE S., 2014- *Systems biology and biotechnology of Streptomyces species for the production of secondary metabolites*. Biotechnology advances, Vol.32(2) :255-268.
- IKEDA H., ISHIKAWA J., HANAMOTO A., SHINOSE M., KIKUCHI H., SHIBA T. et ŌMURA S., 2003- *Complete genome sequence and comparative analysis of the industrial microorganism Streptomyces avermitilis*. Nature biotechnology, Vol.21(5) :526-531.
- JANARDHAN A., KUMAR A., VISWANATH B., SAIGOPAL D. et NARASIMHA G., 2014- *Production of bioactive compounds by actinomycetes and their antioxidant properties*. Biotechnology research international, (2014).
- JENKE-KODAMA H., MÜLLER R. et DITTMANN E., 2008- *Evolutionary mechanisms underlying secondary metabolite diversity*. Natural Compounds as Drugs, Vol. 1 :119-140.
- KAPADIA M., ROLSTON K. et HAN X., 2007- *Invasive Streptomyces infections : six cases and literature review*. American journal of clinical pathology, Vol.127(4) : 619-624.
- KARLOVSKY P., 2008- *Secondary metabolites in soil ecology*. In *Secondary metabolites in soil ecology*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1-19p
- KATSUMI S., KASHI T. et HIROSHI O., 2005- *Pathogen occurrence and antimicrobial susceptibility of urinary tract infection cases during a 20-year period (1983–2002) at a single institution in Japan*. Jpn J Infect Dis, Vol. 58 :303–308.

- KIESER T., BIBB M., BUTTNER M., CHATER, K. F. et HOPWOOD D., 2000-*Practical streptomyces genetics*. Norwich : John Innes Foundation, Vol. 291: 397.
- KOHN P., TAGER M., SIEGEL M. et ASHE R., 1951-*Aerobic actinomycetes septicemia : report of a case*. New England Journal of Medicine, Vol. 245(17) : 640-644.
- KOLSTO A., 1997-*Dynamic bacterial genome organization*. Molecular microbiology, Vol. 24(2) : 241-248.
- KOST C., LAKATOS T., BOTTCHER I., ARENDHOLZ W., REDENBACH M. et WIRTH R., 2007- *Non-specific association between filamentous bacteria and fungus-growing ants*. Naturwissenschaften, Vol. 94 : 821–828.
- LABEDA D., GOODFELLOW M., BROWN R., WARD A., LANOOT B., VANNCANNEYT M., SWINGS J. et KIM SB., 2012- *Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae*. Antonie van Leeuwenhoek, Vol. 101(1) : 73–104.
- LABEDA DP. et KROPPESTEDT R., 2000- *Phylogenetic analysis of Saccharothrix and related taxa : proposal for Actinomycetaceae fam. nov.* Int J Syst Evol Microbiol, Vol. 50 : 331–336.
- LANCINI G. et DEMAIN L., 2013- *Bacterial Pharmaceutical Products, The Prokaryotes – Applied Bacteriology and Biotechnology*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 557-580p.
- LAW J., SER H., KHAN M., CHUAH L., PUSPARAJAH P., CHAN K. et LEE L., 2017- *The potential of Streptomyces as biocontrol agents against the rice blast fungus, Magnaporthe oryzae (Pyricularia oryzae)*. Frontiers in microbiology, Vol. 8 : 3.
- LECHEVALIER M., DE BIEVRE C. et LECHEVALIER H., 1977-*Chemotaxonomy of aerobic actinomycetes : phospholipid composition*. Biochemical Systematics and Ecology, Vol. 5(4) : 249-260.
- LECHEVALIER M. et LECHEVALIER H., 1970- *Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol. 20(4) : 435-443.
- LEMRISS S., LAURENT F., COUBLE A., CASOLI E., LANCELIN J., SAINTPIERRE-BONACCIO D., RIFALI S., FASSOUANE A., BOIRON P., 2003-*Screening of non polyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes*. Canadian Journal Microbiology, Vol. 49(11):669-74.

- LIRAS P. et MARTÍN JUAN F., 2004- *Assay Methods for Detection and Quantification of Antimicrobial Metabolites Produced by Streptomyces clavuligerus*, *Methods in Biotechnology, Microbial Processes and Products*. Humana Press Inc, Vol. 18 : 149-163.
- LIU Q., YU J., YAN J., QI X., LIU C., JIN H., 2009- *Antagonism and action mechanism of antifungal metabolites from Streptomyces rimosus MY02*. *Journal of phytopathology*, Vol. 157(5) : 306-310.
- LOQMAN S., 2009- *La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine*. Thèse de Doctorat. Biologie et Physiologie Végétale., Université de Reims Champagne-Ardenne, 45p.
- MARINELLI F., 2009- *Antibiotics and Streptomyces : the future of antibiotic discovery- Many options for drug discovery are still available*. *Microbiology today*, 36 : 20p.
- MARTIN J., 1989- *Molecular mechanisms for the control by phosphate of the biosynthesis of antibiotic and secondary metabolism*. In : Shapiro S (ed) *Regulation of secondary metabolism of actinomycetes 1*. CRC Press, Boca Raton, 213–237p.
- MEIER-KOLTHOFF J., AUCH A., KLENK H. et GÖKER M., 2013- *Genome sequence-based species delimitation with confidence intervals and improved distance functions*. *BMC bioinformatics*, Vol. 14(1) : 1-14.
- MEKLAT A., 2012- *Taxonomie et potentiel antagoniste des actinomycètes halophiles des sols sahariens et mise en évidence de nouvelles espèces d'actinopolyspora*. Thèse de Doct. Microbiologie., Ecole normale supérieure de kouba-Alger, 4p.
- MELLOULI L., AMEUR-MEHDI RB., SIOUD S., SALEM M. et BEJAR S., 2003- *Isolation, purification and partial characterization of antibacterial activities produced by a newly isolated Streptomyces sp. US24 strain*. *Research in Microbiology*, Vol. 154(5) : 345-352.
- MIAO L., KWONG T., QIAN P., 2006- *Effect of culture conditions on mycelial growth, antibacterial activity, and metabolite profiles of the marine-derived fungus Arthrinium cf saccharicola*. *Applied microbiology and biotechnology*, Vol. 72(5) : 1063-1073.
- MOSS W., SAGER J., DICK, J. et RUFF A., 2003- *Streptomyces bikiniensis bacteremia*. *Emerging infectious diseases*, Vol. 9(2) : 273.

- MOSSAD S., TOMFORD J., STEWART R., RATLIFF N. et HALL G., 1995-*Case report of Streptomyces endocarditis of a prosthetic aortic valve*. Journal of clinical microbiology, Vol.33(12) :3335-3337.
- NASCIMENTO R., COELHO R., MARQUES S., ALVES L., GIRIO F., BON E. et AMARAL-COLLAÇO M., 2002-*Production and partial characterisation of xylanase from Streptomyces sp. strain AMT-3 isolated from Brazilian cerrado soil*. Enzyme and Microbial Technology, Vol.31(4) :549-555.
- NETT M., IKEDA H. et MOORE B., 2009- Genomic basis for natural product biosynthetic diversity in the actinomycetes. *Natural product reports*, 26(11) :1362-1384.
- NGUYEN P., STRUB C., FONTANA A. et SCHORR-GALINDO S., 2017- *Crop molds and mycotoxins : Alternative management using biocontrol*. Biological Control, Vol. 104 :10-27.
- OLANO C., RODRIGUEZ A., MICHEL J., MENDEZ C., RAYNAL M. et SALAS J., 1998-*Analysis of a Streptomyces antibioticus chromosomal region involved in oleandomycin biosynthesis, which encodes two glycosyltransferases responsible for glycosylation of the macrolactone ring*. Molecular and General Genetics MGG, Vol. 259(3) :299-308.
- OMURA S., TANAKA Y., HAMADA H. et MASUMA R., 1984- *Effect of ammonium ion inorganic phosphate and amino acids of the biosynthesis of protylonolide, a precursor of tylosin aglycone*. J. Antibiot. Vol.37 :494-502.
- OSKAY M., 2009-*Antifungal and antibacterial compounds from Streptomyces strains*. African Journal of Biotechnology, Vol.8(13) : 3007-3017.
- OSTASH B., MAKITRINSKY R., WALKER S., et FEDORENKO V., 2009- *Identification and characterization of Streptomyces ghanaensis ATCC14672 integration sites for three actinophage-based plasmids*. Plasmid. Vol. 61(3):171-175
- PRADEAU D. et DAUPHIN C., 2002-*Chromatographie planaire : applications, Éditions Techniques de l'Ingénieur*. Vol. 1476 : 01-10.
- RAO N., GOMEZ-GARCIA M. et KORNBERG A., 2009-*Inorganic polyphosphate : essential for growth and survival*. Annual review of biochemistry, Vol.78 :605-647.
- REBIAHIA S., ABDELOUAHID D., RAHMOUN M., ABDELALI S. et AZZAOU H., 2011-*Emergence of vancomycin-resistant Staphylococcus aureus identified in the Tlemcen university hospital (North-West Algeria)*. Med Maladies Infect, Vol. 41 :646–651.

- REZANKA T., VANĚK Z., KLANOVA K.et PODOJIL M.,1984-*The use of different oies for the cultivation of Streptomyces cinnamonensis*. Folia microbiologica, Vol.29(4):306-309.
 - RODRÍGUEZ-GARCÍA A., BARREIRO C., SANTOS-BENEIT F., SOLA-LANDA A.et MARTÍN J.,2007-*Genome-wide transcriptomic and proteomic analysis of the primary response to phosphate limitation in Streptomyces coelicolor M145 and in a Δ phoP mutant*. Proteomics, Vol.7(14) :2410-2429.
 - SABAOU N., BIJANI C., ZITOUNI A., PONT F., MATHIEU F.et BADJI B.,2017-*Streptomyces sp. AT37 isolated from a Saharan soil produces a furanone derivative active against multidrug-resistant Staphylococcus aureus*. World Journal of Microbiology and Biotechnology, Vol.33(6) :105.
 - SAFFROY S.,2006-*Etude du métabolisme carboné chez Streptomyces pristinaespiralis*. Thèse de Doct. Procédés Biotechnologiques et Alimentaires., Institut National Polytechnique de Lorraine, 7p.
 - SALAS J., QUIROS L., HARDISSON C., 1984- *Pathways of glucose catabolism during germination of Streptomyces spores*. FEMS microbiology letters, Vol. 22(3) :229-233.
 - SAMAC D., WILLERT A., MCBRIDE M.et KINKEL L.,2003-*Effects of antibiotic-producing Streptomyces on nodulation and leaf spot in alfalfa*. Applied soil ecology, Vol.22(1) : 55-66.
 - SANTOS-BENEIT F., 2015- *The Pho regulon: a huge regulatory network in bacteria*. Frontiers in microbiology, 6 -402p.
 - SCHWARZER D., FINKING R.et MARAHIEL M.,2003-*Nonribosomal peptides : from genes to products*. Natural product reports, Vol. 20(3) : 275-287.
 - SEKHSOKH Y., CHADLI M.et EL HAMZAOUI S.,2008-*Fréquence et sensibilité aux antibiotiques des bactéries isolées dans les urines*. Med Mal Infect, Vol.38 :324–32.
 - SHANLEY J., SNYDER K.et CHILD J.,1979-*Chronic pericarditis due to a Streptomyces species*. American journal of clinical pathology, Vol. 72(1) :107-110.
- SHARMA M., DANGI P.et CHOUDHARY M.,2014- *Actinomycetes : source, identification, and their applications*. Int J Curr Microbiol App Sci, Vol.3(2) :801-832.
- SHIRLING E.et GOTTLIEB D.,1966-*Methods for characterization of Streptomyces species*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, Vol.16(3) : 313-340.

- SEIDEL V.,2006- *Initial and bulk extraction*. pp :36-39 cité par Sarker D, Latif Z, Gray A.,
- *Natural products isolation 2nd ed*. Ed. Humana Press Inc., Totowa, New Jersey,515p.
- SMAOUI S.,2010-*Purification et caractérisation de biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés*. Thèse de Doctorat. Génie de Procédés et environnement. Université de Toulouse,22P.
- SMITH T.,2000-*Antibiotics from soil bacteria*. Nature structural biology, Vol.7(3) :189-190.
- SOLECKA J., ZAJKO J., POSTEK M.et RAJNISZ A.,2012-*Biologically active secondary metabolites from Actinomycetes*. Open Life Sciences, Vol.7(3) : 373-390.
- SPIZEK J.et TICHY P.,1995-*Some aspects of overproduction of secondary metabolites*. Floia Microbiol.Vol. 40 :43-50.
- SRIVIBOOL R.et SUKCHOTIRATANA M.,2006-*Bioperspective of actinomycetes isolates from coastal soils : A new source of antimicrobial producers*. Songklanakarin. J. Sci. Technol., Vol.28 : 493-499.
- STACKEBRANDT E.et GOEBEL B.,1994-*Taxonomic note : a place for DNA-DNA reassociation and 16S rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology*. International journal of systematic and evolutionary microbiology, Vol.44(4) :846-849.
- SUJATHA P., RAJU K.et RAMANA T.,2005-*Studies on a new marine streptomycete BT-408 producing polyketide antibiotic SBR-22 effective against methicillin resistant Staphylococcus aureus*. Microbiological research,Vol. 160(2) : 119-126.
- SUWAN N., BOONYING W. et NALUMPANG S.,2012-*Antifungal activity of soil actinomycetes to control chilli anthracnose caused by Colletotrichum gloeosporioides*. J Agric Technol, Vol.8 :725-737.
- TANAKA Y., TAKI A., MASUMA R.et OMURA S.,1986-*Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in Streptomyces fradiae*. J. Antibiot,Vol. 39:813-821.
- TENCONI E., JOURDAN S., MOTTE P., VIROLLE M.et RIGALI S.,2012-*Extracellular sugar phosphates are assimilated by Streptomyces in a PhoP-dependent manner*. Antonie Van Leeuwenhoek, Vol.102(3): 425-433.
- THAKUR D., BORA T., BORDOLOI G.et MAZUMDAR S.,2009-*Influence of nutrition and culturing conditions for optimum growth and antimicrobial metabolite production by Streptomyces sp. 201*. Journal de Mycologie Medicale, Vol.19(3) :161-167.

- THAKUR D., YADAV A. et GOGOI B., 2007-*Isolation and screening of Streptomyces in soil of protected forest areas from the state of Assam and Tripura, India for antimicrobial metabolites.* J Mycol Assam and Tripura, India for antimicrobial metabolites. J Mycol Med, Vol.17 :242–249.
- THOMSON C., POWER E., RUEBSAMEN-WAIGMANN H. et LABISCHINSKI H., 2004-*Antibacterial research and development in the 21st Century—an industry perspective of the challenges.* Current opinion in microbiology, Vol. 7(5) :445-450.
- TOKALA R., STRAP J., JUNG C., CRAWFORD D., SALOVE M., DEOBALD L., BAILEY J. et MORRA M. 2002-*Novel plant–microbe rhizosphere interaction involving Streptomyces lydicus WYEC108 and the pea plant (Pisum sativum).* Appl. Environ. Microbiol, Vol.68 :2161–2171.
- URSAN M., BOIU-SICUIA O.A., VOAIDES C., STAN V., BUBUEANU C. et CORNEA C., 2018-*The potential of new Streptomyces isolates as biocontrol agents against Fusarium spp.* In “Agriculture for Life, Life for Agriculture” Conference Proceedings, Vol.1 :594-600.
- VARA J., LEWANDOWSKA-SKARBEK M., WANG Y., DONADIO S. et HUTCHINSON C., 1989-*Cloning of genes governing the deoxysugar portion of the erythromycin biosynthesis pathway in Saccharopolyspora erythraea (Streptomyces erythreus).* Journal of bacteriology, Vol.171(11) :5872-5881.
- VONOTHINI G., MURUGAN M., SIVAKUMAR K. et SUDHA S., 2008-*Optimization of protease production by an actinomycete strain, PS-18A isolated from an estuarine shrimp pond.* African journal of biotechnology, Vol.7(18).
- WATVE M., TICKOO R., JOG M., BHOLE B., 2001-*How many antibiotics are produced by the genus Streptomyces ?* Arch Microbiol, Vol.176(5) : 386–90.
- WERDER E. ET SONNABEND W., 1973-*Neonatal infection with Streptomyces pelletieri.* American Journal of Diseases of Children, Vol.125(3) : 439-441.
- WILLIAMS S., GOODFELLOW M., ALDERSON G., WELLINGTON E., SNEATH P. et SACKIN M., 1983- *Numerical classification of Streptomyces and related genera.* Microbiology, Vol. 129(6) :1743-1813.
- WRIGHT F., BIBB M., 1992-*Codon usage in the G+ C-rich Streptomyces genome.* Gene, Vol.113(1) :55-65.

- ZAYET S., BERRICHE A., BATTIKH H., ZRIBI M., FENDRI C., et BENAÏSSA, H., 2019-*Abcès cutanés à streptomyces rectiverticillatus au cours d'un déficit en interleukine 12*. La Presse Médicale, Vol. 48(1) : 85-87.
- ZHANG H., ZHANG W., JIN Y., JIN M. et YU X., 2008-*A comparative study on the phylogenetic diversity of culturable actinobacteria isolated from five marine sponge species*. Antonie Van Leeuwenhoek, Vol.93 :241–248.
- ZOUAGHI A., 2007-*Optimisation de la production de l'Oxytétracycline par Streptomyces rimosus*. Thèse de Doctorat. Biologie Industrielle., Université 7 Novembre de Carthage, 11p.
- YILMA S., CANNON-SYKORA J., SAMOYLOV A., LO T., LIU N., BRINKER C., NEELY W. et VODYANOY V., 2007-*Large-conductance cholesterol–amphotericin B channels in reconstituted lipid bilayers*. Biosensors and Bioelectronics, Vol.22(7):1359-1367.
- YU D., XU F., ZENG J., ZHAN J., 2012-*Type III polyketide synthases in natural product biosynthesis*. IUBMB life, Vol.64(4) :285-295.

Annexe



ANNEXE N° 1

MILIEUX DE CULTURE

II. Milieu d'identification des Actinobactéries« *Streptomyces*»

1. Etude morphologique

Les milieux ISP (International *Streptomyces* Project) préconisés par Shirling et Gottlieb (1966) ont été utilisés pour production de mélanine. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

1.1. Milieu ISP2

Extrait de levure : 4 g, extrait de malt :10 g, glucose :4 g, agar :16 g, eau distillée :1 L, pH=7,2. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

1.2 Milieu ISP3

Farine d'avoine : 20 g. Solution saline standard : 1 ml. Agar : 20 g. Eau distillée : 1 L. PH=7.2. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

1.3 Milieu ISP4

Amidon : 10 g, K₂HPO₄ : 1 g, MgSO₄, 7H₂O : 1 g, NaCl : 1 g, (NH₄)₂SO₄ : 2 g, CaCO₃ : 2 g. Agar : 20 g, Eau distillée : 1L. PH= 7.2. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

1.4 Milieu ISP5

Asparagine : 1 g, Glycérol : 10 g, K₂HPO₄ :1 g, Solution d'oligo-éléments :1ml, Agar : 20g, PH = 7.4. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

1.5 Milieu ISP6

Peptone : 20 g, citrate ferrique ammoniacal :0.5 g, K₂HPO₄ 1g, thiosulfate de sodium :0.08 g, extrait de levure : 1 g, agar : 15 g, eau distillée : 1 L, pH =7.0. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

1.6 Milieu ISP7

Glycérol : 15 g, L-tyrosine : 0.5g, L-asparagine : 1 g, K₂HPO₄ : 0.5g, MgSO₄,7H₂O : 0.5 g, NaCl : 0.5g/L, FeSO₄-7H₂O : 0.01g, solution saline standard :1 ml, agar : 18g, pH= 7.2. (SHIRLING et GOTTLIEB, 1966)

ANNEXE N° 2

Méthode de Becker

Des cellules séchées (10 mg) ont été hydrolysées pendant 18 heures avec 1 ml de HCl 6 N dans un tube Pyrex scellé et maintenu à 100 °C dans un bain de sable. Après refroidissement, les tubes ont été ouverts et le contenu filtré à travers du papier. Le matériau solide sur le papier a été lavé avec 3 gouttes d'eau distillée. L'hydrolysate liquide a été séché trois fois de suite dans un bain de vapeur pour éliminer la majeure partie du HCl. (BECKER *et al.*, 1964)

Le résidu a été repris dans 0,3 ml d'eau distillée et 20 litres du liquide ont été déposés sur du papier Whatman n° 1. Les papiers sont développés durant 18 h par chromatographie descendante à front perdu dans un système de solvants composé de méthanol, eau distillée, HCl 10 N et pyridine (80-17,5-2,5-10 par volume). Un spot de 10 microlitres d'acide diaminopimélique 0,01 M (mélange des isomères LL et DL) et d'une solution de glycine à 0,2% sont utilisés comme standards et chromatographiés en même temps. (AOUCHE, 2013)

En plongeant les papiers chromatogrammes dans un bain de ninhydrine acétonique (0,1 %, p/v), puis en les chauffant pendant 2 min à 100 °C. Les taches d'acide diaminopimélique étaient vert olive et devenaient jaunes f. La forme LL migre plus rapidement que la forme DL. la glycine en donne des taches de couleur pourpres et ont voyagé plus vite que l'acide diaminopimélique. (BEKER *et al.*, 1964)