

La demande croissante de nouveaux composés bioactifs pour lutter contre l'évolution de la Multi-Résistance aux Médicaments (MRM) nécessite des recherches sur les micro-organismes dans différents environnements afin d'identifier de nouvelles molécules puissantes. Dans cette étude, un dépistage initial concernant l'activité antimicrobienne de 45 isolats d'*Actinomycètes* isolés à partir de deux écosystèmes telluriques distincts, un écosystème naturel normal et un écosystème froid ( $T_{\min}$ : 6–10°C) au Maroc a été effectué. Des criblages primaires et secondaires ont été réalisés contre *Candida albicans* ATCC 60193, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, d'autres bactéries MRM cliniques et 13 champignons phytopathogènes. Sur la base des résultats obtenus, 12 isolats actifs ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie. Les 12 isolats microbiens ont été identifiés sur la base de leurs caractères morphologiques, micro-morphologiques, physiologiques et biochimiques et leur identification moléculaire a été réalisée en utilisant l'homologie de la séquence d'ARNr 16S. 11 isolats avaient une similarité maximale de 97 - 99 % avec le genre *Streptomyces* sp., tandis qu'un isolat n'avait que 91,61 % de similarité avec *Streptomyces avermitilis*.

L'activité antioxydante a été examinée par le biais de trois tests : DPPH, ABTS et FRAP, tandis que l'effet cytotoxique a été évalué en examinant l'activité des extraits contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négatif (MDA-MB-468). Les résultats de l'activité antioxydante ont indiqué que l'extrait dichlorométhane souche SCJ de *Streptomyces* sp. OP101646 a montré l'activité de piégeage la plus élevée contre le radical DPPH ( $38,61 \pm 1,43$ ), contre ABTS ( $36,83 \pm 01,43$ ), ainsi que le pouvoir antioxydant réducteur de fer le plus élevé.

Les résultats de l'activité anticancéreuse ont révélé que l'effet de l'extrait dichlorométhane de la souche SCJ de *Streptomyces* sp. OP101646 sur la lignée cellulaire triple négative (MDA-MB-468) a présenté un degré raisonnable d'activité anticancéreuse entraînant une inhibition de  $62,76 \pm 0,62$  % avec une valeur d' $CI_{50}$  de  $19,91 \pm 0,20$  µg/mL. De plus, la détermination quantitative par UV-vis a montré une activité hémolytique négligeable des extraits testés contre la lignée cellulaire normale (globules rouges) aux différentes doses testées (0,125, 0,625, 1,25 et 3,12 mg/mL) à l'exception de l'extrait Dichlorométhane de la souche E25-12 qui a montré un taux d'hémolyse de  $83,25 \pm 1,03$  % à une concentration de 3,12 mg/mL. En outre, l'analyse UV-visible des extraits dichlorométhane a également révélé l'absence de molécules de nature polyénique. L'extrait dichlorométhane SCJ de la souche la plus active a ensuite été soumis à une analyse chimique par CPG-SM et a révélé la présence de 21 composés volatils, dont la pyrrolopyrazine (98 %), le phénol (96 %), le maltol (81 %) et l'acide benzène-acétique (90 %) qui pourraient expliquer les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et cytotoxiques observées. En outre, cette étude a démontré une corrélation positive significative ( $p < 0,0001$ ) entre les contenus phénoliques et flavonoïdes totaux et la capacité anti-oxydante, ouvrant la voie à une caractérisation plus poussée de ces isolats de *Streptomyces* sp. pour leur utilisation optimale à des fins anticancéreuses, antioxydantes et antimicrobiennes.

**Mots clés :** *Streptomyces* sp, activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuse, souches MRM,



Université Hassan 1<sup>er</sup>  
Centre d'Études Doctorales en Sciences  
et Techniques & Sciences Médicales



Faculté des Sciences et Techniques  
Settat

## THÈSE DE DOCTORAT

Pour l'obtention de grade de Docteur en Sciences Biologiques

Formation Doctorale: Biologie, Santé et Environnement

Spécialité: Microbiologie et Biotechnologie

Sous le thème

### Contribution à la caractérisation moléculaire de nouvelles souches de *Streptomyces* productrices de métabolites antimicrobiens, antioxydants et anticancéreux isolés d'écosystèmes telluriques extrêmes marocains

Présentée par :

**Saïd RAMMALI**

Soutenue le: 16/12/2022 à 10 h

A la Faculté des Sciences et Techniques de Settat devant le jury composé de :

Pr. Bouchaib BENCHARKI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Président
Pr. Omar CHARAFEDDINE	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Mohammedia	Rapporteur
Pr. Abdellah EL KANOUNI	PES	Faculté des Sciences Ben M'sik, Casablanca	Rapporteur
Pr. Hinde Aassila	PHB	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Rapporteuse
Pr. Saïd HILALI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Examineur
Pr. Aziz BAIDANI	PHB	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Examineur
Pr. Lahoucine HILALI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Co-directeur de thèse
Pr. Abdelkrim KHATTABI	PES	Faculté des Sciences et Techniques, Settat	Directeur de thèse

Année Universitaire: 2022/2023

Saïd RAMMALI

Contribution à la caractérisation moléculaire de nouvelles souches de *Streptomyces* productrices de métabolites antimicrobiens, antioxydants et anticancéreux isolés d'écosystèmes telluriques extrêmes marocains

2022  
Biologie, Santé et Environnement

# **Avant-propos**

## **Avant-propos**

Ce présente travail de recherche intitulé «**Contribution à la caractérisation moléculaire de nouvelles souches de *Streptomyces* productrices de métabolites antimicrobiens, antioxydants et anticancéreux isolées d'écosystèmes telluriques extrêmes marocains**» a été réalisé dans le cadre de mon projet de thèse. Le travail a été effectué au sein du Laboratoire de recherche Agroalimentaire et Santé (AS) de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat (FSTS).

Nom et prénom de l'auteur : **Said RAMMALI**

➤ Encadrant:

- **Abdelkrim KHATTABI, Professeur.**

- Laboratoire de recherche Agroalimentaire et Santé (AS), Faculté des Sciences et Techniques de Settat, Université Hassan 1<sup>er</sup> Settat, Maroc.

➤ Co-encadrant:

- **Lahoucine HILALI, Professeur.**

- Laboratoire de recherche Agroalimentaire et Santé (AS), Faculté des Sciences et Techniques de Settat, Université Hassan 1<sup>er</sup> Settat, Maroc sous la direction de Monsieur le Professeur **Bouchaib BENCHARKI.**

➤ Laboratoires où les travaux de cette thèse ont été réalisés:

- Laboratoire de recherche Agroalimentaire et Santé (AS) de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat sous la direction de Monsieur le Professeur **Bouchaib BENCHARKI.**

- Centre Régional d'Analyse et de Caractérisation, Faculté des Sciences et Techniques de Settat, Université Hassan 1<sup>er</sup> Settat, Maroc sous la direction de Monsieur **Abderrahim HASRI.**

- Équipe d'oncologie expérimentale et substances naturelles, Immuno-pharmacologie cellulaire et moléculaire, Faculté des Sciences et de la Technologie, Université Sultan Moulay Slimane, Beni-Mellal, Maroc sous la direction de Monsieur le Professeur **Abdelmajid ZYAD.**

- Institut de la Fondation Marocaine pour les Sciences avancées, l'Innovation et la Recherche (MAScIR).

- Institut National de la Recherche Agronomique (INRA, Rabat Maroc) sous la direction de Madame le Professeur **Fatima GABOUNE.**

-Laboratoire de Biochimie, Neurosciences, Ressources Naturelles et Environnement (BNRNE), Faculté des Sciences et Techniques de Settat, Université Hassan 1<sup>er</sup> Settat, Maroc, sous la direction de Monsieur le Professeur **Abdel Khalid ESSAMADI**.

- Laboratoire de bactériologie moléculaire, Institut Pasteur du Maroc, Casablanca, Maroc sous la direction de Monsieur le Professeur **Mohammed TIMINOUNI**.

➤ Période de réalisation de la thèse : de Janvier 2017 à Décembre 2022.

## **Publications dans des revues scientifiques internationales**

**Said Rammali**, Lahoucine Hilali, Khadija Dari, Bouchaib Bencharki, Abdellatif Rahim, Mohammed Timinouni, Fatima Gaboune, Mohamed El Aalaoui, Abdelkrim Khattabi. Antimicrobial and antioxidant activities of *Streptomyces* species from soils of three different cold sites in the Fez-Meknes region Morocco. *Scientific Reports* (2022)1–22. <https://doi.org/10.1038/s41598-022-21644-z>.

**Said Rammali**, Mohamed El Aalaoui, Mohamed Sbaghi, Lahoucine Hilali, Khadija Dari, Bouchaib Bencharki, Abdelkrim khattabi. Insecticidal potential of *Streptomyces* sp. dichloromethane extracts against the cactus cochineal *Dactylopius Opuntiae* (Cockerell). *Journal of Invertebrate Pathology* (2022) **(Under review)**.

El Aanachi, Soukaina. Gali, Lynda. **Rammali, Said**. Bensouici, Chawki. Aassila, Hinde. Dari, Khadija. 2021. *In vitro* study of the antioxidant, photoprotective, anti-tyrosinase, and anti-urease effects of methanolic extracts from leaves of 6 Moroccan Lamiaceae. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 15, 1785–1795. <https://doi.org/10.1007/s11694-020-00759-9>.

## **Communications orales et affichées**

**S. Rammali**, S. Elaanachi, K. Dari, B. Bencharki, L. Hilali, A. Khattabi. Evaluation of Actinobacterial biological activities against multi-resistant pathogens. 7ème édition de la journée doctorant, 02 Mai 2019, Université Hassan 1 er Settat, Faculté des Sciences et Techniques de Settat [**Présentation orale**].

**S. Rammali**, S. Elaanachi, K. Dari, B. Bencharki, L. Hilali, A. Khattabi. Extraction de nouvelles molécules bioactives chez des bactéries *Actinomycètes* isolées à partir du sol et évaluation de leurs activités Antimicrobiennes contre divers microorganismes multi-résistants aux antibiotiques. 1er édition de la journée doctorant : Water, Energy & Environnent Nexus, 12-14 juin 2019, Université Mohammed V, Rabat [**Présentation orale**].

**S. Rammali**, S. Elaanachi, K. Dari, B. Bencharki, L. Hilali, A. Khattabi. Evaluation of Actinobacterial biological activities against multi-resistant pathogens. **Congrès international**

: “Microbial Biotechnology for Development” "MICROBIOD4", 24-26 Avril 2019, Agadir, Maroc [**Présentation affichée**].

**S. Rammali**, S. Elaanachi, K. Dari, B. Bencharki, L. Hilali , A. Khattabi. Exploration du potentiel antimicrobien d'*Actinomycètes* isolées du sol marocain. **Congrès international:** Microbial biotechnologies and socio-economic development opportunities, 16-18 Octobre, Ifrane, Association Marocaine de Microbiologie, Université AL Akhawayn [**Présentation affichée**].

**S. Rammali**, S. Elaanachi, K. Dari, B. Bencharki, L. Hilali, A. Khattabi. Recherche de l'activité Antimicrobienne et antioxydant des souches d'*Actinomycètes* isolées à partir du sol. 6ème édition de la journée doctorant, 5 Avril 2018, Université Hassan 1<sup>er</sup> Settat, Faculté des Sciences et Techniques de Settat [**Présentation affichée**].

## **Remerciement**

*Ogu" tgo gtekg o gpvu" uøcftguugpv" «" ALLAH." ng" vqww" rwwkuucpv" swk" oøc" fqqp<sup>2</sup>" nc" hqteg" gv" ng" eqwtci g" føcejxgt" eg" vtcxc kn0*

*Je tiens à remercier Messieurs le **Président de l'Université Hassan 1<sup>er</sup>** et le **Doyen de la Faculté des Sciences et Techniques de Settat** r qwt" nøghhqt v" gv" ng" uqwwk gp" swøknu" ceeqt fgpv" «" nc" recherche scientifique.*

*Les travaux présentés dans ce manuscrit ont été réalisé au sein du laboratoire de recherche Agroalimentaire et Santé, Faculté des Sciences et Techniques de Settat sous la direction du Professeur **Abdelkrim KHATTABI**." gv" nø<sup>2</sup> swkrg" f)qpeqni kg" g z r<sup>2</sup> tk o gpvc ng" gv" fgu" uwduvcegu" naturelles, Immuno-pharmacologie cellulaire et moléculaire, Faculté des sciences Techniques, Université Sultan Moulay Slimane, Beni-Mellal, Maroc sous la direction du Professeur **Abdelmajid ZYAD**. Je remercie également les Professeurs **Bouchaib BENCHARKI** et **Abdel Khalid ESSAMADI** Directeurs du Centre d'Etudes Doctorales pour le bon suivi de mes formations doctorales et pour toute l'aide administrative. Je tiens à remercier sincèrement le Professeur **Boubker NASSER** Vice Doyen chargé de la recherche scientifique et des relations extérieures.*

*Je vous adresse ma gratitude avec mes remerciements à mon directeur de thèse le Professeur **Abdelkrim KHATTABI**, pour m'avoir donné l'opportunité d'être un élément de son équipe, pour son esprit d'ouverture et pour son dynamisme qu'il insuffle à son équipe. Je vous remercie de m'avoir accordé votre confiance, de m'avoir soutenu, et de m'avoir permis de réaliser ce travail. Soyez assuré, Monsieur de ma sincère gratitude et de mon profond respect.*

*Je tiens à remercier vivement mon co-directeur de thèse le Professeur **Lahoucine HILALI** pour toute son aide, cela ne sera pas suffisant pour exprimer toute ma gratitude pour la confiance, la disponibilité, la générosité, le soutien scientifique et le grand soutien qu'ils ont apportés à la réalisation de ce travail.*

*Meu" xkhu" tgo gtekg o gpvu" uøcftguugpv" cwz" o godtgu" fw" lwt{0" Ogtek" cw" Rt0 **Omar CHARAFEDDINE**, au Pr. **Hinde AASSILA**, au Pr. **Abdellah EL KANOUNI** føcxqkt" ceegr v<sup>2</sup>" fø<sup>2</sup>xcnwgt" eg" vtcxc kn" gp" swcnkv<sup>2</sup>" fg" t c r r q t v g w t u 0" Ogtek" cw" Rt0 **Said HILALI**, Merci au Pr. **Aziz BAIDANI** føcxqkt" ceegr v<sup>2</sup>" fø<sup>2</sup>gzc okpgt" et fø<sup>2</sup>xcnwgt" eg" modeste travail.*

*Il m'est également agréable de remercier Monsieur le professeur **Bouchaib BENCHARKI**, directeur du Laboratoire de recherche Agroalimentaire et qu'il trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'attention qu'il a accepté de porter à ce travail et pour avoir accepté de présider le jury de la soutenance de ma thèse.*

*Je tiens à remercier également tous l'équipe du laboratoire de recherche Agroalimentaire et Santé : **Hajare ERRATI, Abdelati OUAMANI et Hasna ELHJOUJI** pour leurs soutiens.*

*Je remercie vivement **Abderrahim HASRI** Tgurgpucdng"fw"Egprtg"t<sup>2</sup>ikqpcn" føcpcn{ug"gv"fg" caractérisation, Faculté des Sciences et techniques de Settat pour son aide et sa disponibilité pour la réalisation des analyses de sol par MEB et Diffraction par Rayons X, je remercier également **Abderrahim AASFAR** Responsable de la chromatographie en phase gazeuse en Institut de la Fondation marocaine pour les sciences avancées, l'innovation et la recherche (MAScIR) rqrwt"uqp"ckfg"gv"uc"fkurqpkdkkv<sup>2</sup>"rqrwt"nc"t<sup>2</sup>cnkucvkqp"fg"nøcpcn{ug"CPG-SM.*

*Je tiens à remercier tout particulièrement et à témoigner toute ma reconnaissance à mes collègues : **Mohamed EL AALAOUI, Abdellatif RAHIM, Fatima azzahra KAMAL, Younes EL GOUMI, Mohamed IDRISSE, Abderrahim AASFAR, Soukaina ESSADIK, Saad SALHI, Omar RIMI, Samira HENTOUR, Aicha HABACH, Hajare ERRATI, Abdelati OUAMANI, Youssef CHEGDALI, Noureddine MESSAOUDI, Lahcen AKIKI, Mostapha MADOUNI, Mohammed MOUTAFATINE**, Grâce à vous, j'ai pu avoir des discussions scientifiques intéressantes, échanger des éclats de rire et partager des moments mémorables.,*



## ***Dédicace***

*Un grand merci à tous les membres de ma famille qui m'ont guidé et soutenu moralement tout au long de ma thèse, surtout à mes parents **Bouchaïb RAMMALI**, qui est décédé récemment et qui serait content de savoir que son fils a enfin terminé le travail qu'il avait commencé, et ma mère **Khadija LAHRACH** qui ont toujours cru en moi, vous étiez toujours là pour m'aider, m'encourager et me pousser en avant.*

*Un merci spécial à mes frères **Hicham RAMMALI**, **Mohamed RAMMALI** et ma sœur **Fatima Azzahra RAMMALI**. Je ne peux pas exprimer à travers ces lignes tous mes sentiments d'amour et de tendresse envers chacun d'entre vous. Que l'amour et la fraternité nous unissent à jamais.*

*Et enfin, je voudrais dire que la réalisation de cette thèse n'aurait jamais été possible, sans la contribution de toutes les personnes de mon entourage qui m'ont aidée d'une manière ou d'une autre.*

## Résumé

La demande croissante de nouveaux composés bioactifs pour lutter contre l'évolution de la Multi-Résistance aux Médicaments (MRM) nécessite des recherches sur les micro-organismes dans différents biotopes afin d'identifier de nouvelles molécules de synthèse puissantes. Dans cette étude, un dépistage initial concernant l'activité antimicrobienne de 45 isolats d'*Actinomycètes* isolés à partir de deux écosystèmes telluriques distincts et microbiologiquement inexplorés, un écosystème naturel normal et un écosystème froid ( $T_{\min}$  : 6 – 10°C) au Maroc a été effectué. Des criblages primaires et secondaires ont été réalisés contre *Candida albicans* ATCC 60193, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, d'autres bactéries MRM cliniques et 13 champignons phytopathogènes. Sur la base des résultats obtenus, 12 isolats actifs ont été sélectionnés pour une étude plus approfondie. Les 12 isolats microbiens ont été identifiés sur la base de leurs caractères morphologiques, micro-morphologiques, physiologiques et biochimiques, et leur identification moléculaire a été réalisée en utilisant l'homologie de la séquence d'ARNr 16S. 11 isolats avaient une similarité maximale de 97 – 99 % avec le genre *Streptomyces* sp., tandis qu'un isolat avait 91,61 % de similarité avec *Streptomyces avermitilis*. L'activité antioxydante a été examinée par le biais de trois tests : DPPH, ABTS et FRAP, tandis que l'effet cytotoxique a été évalué en examinant l'activité des extraits contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468). Les résultats de l'activité antioxydante ont indiqué que l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ a montré l'activité de piégeage la plus élevée contre le radical DPPH ( $38,61 \pm 1,43$ ), contre ABTS ( $36,83 \pm 1,43$ ), ainsi que le pouvoir antioxydant réducteur de fer le plus élevé. Les résultats de l'activité anticancéreuse ont révélé que l'effet de l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 sur la lignée cellulaire triple négative (MDA-MB-468) a présenté un degré raisonnable d'activité anticancéreuse entraînant une inhibition de  $62,76 \pm 0,62$  % avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $19,91 \pm 0,20$  µg/mL. De plus, la détermination quantitative par UV-vis a montré une activité hémolytique négligeable des extraits testés contre la lignée cellulaire normale (globules rouges) aux différentes doses testées (0,125, 0,625, 1,25 et 3,12 mg/mL). L'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ la plus active a ensuite été soumis à une analyse chimique par CPG-SM et a révélé la présence de 21 composés volatils, dont la pyrrolopyrazine (98 %), le phénol (96 %), le maltol (81 %) et l'acide benzène-acétique (90 %) qui pourraient expliquer les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et cytotoxiques

observées. En outre, cette étude a démontré une corrélation positive significative ( $p < 0,0001$ ) entre les contenus phénoliques et flavonoïdes totaux et la capacité antioxydante, ouvrant la voie à une caractérisation plus poussée de ces isolats de *Streptomyces* sp. pour leur utilisation optimale à des fins anticancéreuses, antioxydantes et antimicrobiennes.

**Mots clés :** *Streptomyces* sp., activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuse, souches multirésistantes, séquence du gène de l'ARNr 16s, CPG-SM, UV-visible, l'effet cytotoxique, MDA-MB-468.

## Abstract

The increasing demand for new bioactive compounds to combat the evolution of Multi-Drug Resistance (MDR) requires research on microorganisms in different environments in order to identify new potent synthetic molecules. In this study, initial screening regarding the antimicrobial activity of 45 *Actinomycetes* isolates isolated from two distinct terrestrial ecosystems, a normal natural and cold ecosystems ( $T_{\min}$  : 6 - 10°C) in Morocco was carried out. Primary and secondary screening were performed against *Candida albicans* ATCC 60193, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579, other clinical MDR bacteria, and thirteen phytopathogenic fungi. Based on the results obtained, 12 active isolates were selected for further study. The 12 microbial isolates were identified based on morphological, micro-morphological, physiological and biochemical characters and their molecular identification was performed using 16S rRNA sequence homology. Eleven isolates had a maximum similarity of 97 – 99 % to the genus *Streptomyces* sp., while one isolate had only 91.61 % similarity to *Streptomyces avermitilis*. The antioxidant activity was examined through three assays: DPPH, ABTS and FRAP, while the cytotoxic effect was evaluated by examining the activity of the extracts against the human breast carcinoma cell line triple negative (MDA-MB-468). The results of antioxidant activity indicated that the dichloromethane extract of SCJ strain showed the highest scavenging activity against DPPH radical ( $38.61 \pm 1.43$ ), against ABTS ( $36.83 \pm 01.43$ ), as well as the highest iron reducing antioxidant power. The results of anticancer activity revealed that the effect of dichloromethane extract of *Streptomyces* sp. strain SCJ OP101646 on the cell line triple negative (MDA-MB-468) exhibited a reasonable degree of anticancer activity resulting in  $62.76 \pm 0.62$  % inhibition with IC<sub>50</sub> value of  $19.91 \pm 0.20$  µg/mL. In addition, quantitative determination by UV-vis showed negligible hemolytic activity of the tested extracts against the normal cell line (red blood cells) at the different doses tested (0.125, 0.625, 1.25 and 3.12 mg/mL). The dichloromethane extract of the most active SCJ strain was then subjected to chemical analysis by GC-MS and revealed the presence of 21 volatile compounds, including pyrrolopyrazine (98 %), phénol (96 %), maltol (81 %), and benzene acetic acid (90 %) that could explain the observed antimicrobial, antioxidant and cytotoxic properties. This study demonstrated a significant positive correlation ( $p < 0.0001$ ) between total phenolic and flavonoid contents and antioxidant capacity, paving the way for further characterization of

these *Streptomyces* sp. isolates for their optimal use for anticancer, antioxidant and antimicrobial purposes.

**Keywords:** *Streptomyces* sp., antimicrobial, antioxidant and anticancer activities, MDR strains, 16s rRNA gene sequence, GC-MS, UV-visible, cytotoxic effect, MDA-MB-468.

## ملخص

إن الطلب المتزايد على المركبات النشطة بيولوجيًا المكتشفة حديثًا لمكافحة تطور مقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية يتطلب بحثًا عن الكائنات الحية الدقيقة في بيئات مختلفة لتحديد جزيئات فعالة جديدة. في هذه الدراسة، تم إجراء فحص أولي يتعلق بالنشاط المضاد للميكروبات لـ 45 سلالة من الأكتينوميسات (الجراثيم الشعاعية) المعزولة من نظامين بيئيين مختلفين في المغرب (نظام إيكولوجي طبيعي ونظام إيكولوجي بارد).

بناءً على النتائج التي تم التوصل إليها، تم اختيار 12 سلالة نشطة لمزيد من الدراسة. تم التعرف على السلالات المجهرية الاثني عشر على أساس خصائصها المورفولوجية والمورفولوجية الدقيقة والفسولوجية والكيميائية الحيوية وتم تحديد هويتها الجزيئية باستخدام تماثل تسلسل ARNr 16S. أظهرت نتائج التحليل الجزيئي لفائدة 12 عزلة الاكتينوميسات أن 11 عزلة كان لها تشابه أقصى 97 - 99% مع جنس *Streptomyces sp.*، بينما كان لدى عزلة واحدة 91.61% تشابه مع *Streptomyces avermitilis*. تم فحص نشاط مضادات الأكسدة من خلال ثلاثة اختبارات: DPPH و ABTS و FRAP، بينما تم تقييم التأثيرات السامة للخلايا من خلال فحص نشاط المستخلصات ضد خلايا سرطان الثدي البشري (MDA-MB-468).

أشارت نتائج نشاط مضادات الأكسدة إلى أن مستخلص ثنائي كلورو ميثان من سلالة SCJ أظهر أعلى فعالية في الكسح ضد جذور DPPH ( $38.61 \pm 1.43$ )، ضد جذور ABTS ( $36.83 \pm 1.43$ )، وكذلك أعلى قوة مضادة للأكسدة مخفضة لأيون الحديد. كشفت نتائج النشاط المضاد للسرطان أن تأثير المستخلص ثنائي الكلور الميثاني لسلالة SCJ *Streptomyces sp.* OP101646 على سلالة الخلايا (MDA-MB-468) أظهر درجة عالية من النشاط المضاد للسرطان مما أدى إلى تثبيط بنسبة 62.76%.

بالإضافة إلى ذلك، أظهرت المعايير بواسطة الأشعة فوق البنفسجية/الضوء المرئي نشاطًا انحلاليًا ضئيلاً للمستخلصات التي تم اختبارها مقابل سلالة الخلايا الطبيعي (خلايا الدم الحمراء) عند الجرعات المختلفة التي تم اختبارها (0.125 و 0.625 و 1.25 و 3.12 mg/mL). وقد كشف التحليل الكيميائي بواسطة MS/GC لمستخلص ثنائي كلورو ميثان من سلالة SCJ الأكثر نشاطًا عن وجود 21 مركبًا متطايرًا، بما في ذلك pyrrolopyrazine (98%) وحمض البنزويك (90%) والذي يمكن أن يفسر الخصائص المضادة للميكروبات ومضادات الأكسدة والسموم الخلوية.

أظهرت هذه الدراسة ارتباطًا إيجابيًا كبيرًا ( $p > 0.0001$ ) بين إجمالي محتويات بوليفينول، مركبات الفلافونويد والقدرة المضادة للأكسدة، مما يمهد الطريق لمزيد من توظيف هذه *Streptomyces sp.* لاستخدامها الأمثل للأغراض المضادة للسرطان ومضادات الأكسدة ومضادات الميكروبات.

**الكلمات المفتاحية:** *Streptomyces sp.*، الأنشطة المضادة للميكروبات، مضادات الأكسدة ومضادات السرطان، سلالات MRM، تسلسل الجينات rRNA 16s، CPG-SM، تأثير الأشعة فوق البنفسجية/الضوء المرئي، التأثير السام للخلايا.

# Sommaire

Introduction générale.....	2
Revue bibliographique.....	5
1 Les maladies infectieuses .....	6
1.1 Les infections causées par les bactéries pathogènes.....	6
1.2 Les infections causées par les champignons phytopathogènes .....	6
2 Problématique de la résistance bactérienne.....	7
2.1 Histoire des antibiotiques .....	7
2.2 Résistance bactérienne.....	8
2.2.1 Résistance bactérienne intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité).....	9
2.2.2 Résistance bactérienne acquise .....	9
2.3 Origine de l'émergence des résistances acquises .....	9
2.4 Evolution des bactéries multirésistantes aux antibiotiques .....	9
2.5 Mécanisme de résistance .....	10
3 Généralité sur les <i>Actinomycètes</i> .....	11
3.1 Historique .....	11
3.2 Définition et caractéristique générale .....	11
3.3 Morphologie des <i>Actinomycètes</i> .....	12
3.4 Biologie des <i>Actinomycètes</i> .....	14
3.5 Taxonomie des <i>Actinomycètes</i> .....	14
3.6 Ecologie des <i>Actinomycètes</i> .....	16
3.7 Cycle de développement des <i>Actinomycètes</i> .....	17
3.8 Application des <i>Actinomycètes</i> .....	18
3.8.1 Le genre <i>Streptomyces</i> .....	19
3.8.1.1 Classification et caractéristiques générales .....	19
3.8.1.2 Structure du chromosome linéaire de <i>Streptomyces</i> .....	20
3.8.1.3 Cycle de vie des <i>Streptomyces</i> .....	21
3.8.1.4 Production de métabolites secondaires par le genre <i>Streptomyces</i> .....	22

3.8.1.4.1	Définition et généralités.....	22
3.8.1.4.2	Production d'antibiotiques.....	22
3.8.1.4.3	Production d'enzymes.....	26
3.8.1.4.4	Production de pigments.....	26
3.8.1.4.5	Probiotiques .....	27
3.8.1.4.6	Production des bioherbicides.....	27
3.8.1.4.7	Production d'agents anti-tumoraux.....	27
Matériel et Méthodes.....		29
Chapitre I: Isolement et screening des isolats d'Actinomycètes pour leur activité antimicrobienne.....		30
1	Isolement des <i>Actinomycètes</i> .....	31
1.1	Lieux d'échantillonnage et collecte d'échantillons de sol.....	31
1.2	Analyses physico-chimiques des échantillons de sol .....	33
1.3	Prétraitement des échantillons de sol.....	33
1.4	Isolement, purification et conservation des souches d' <i>Actinomycètes</i> .....	33
2	Les microorganismes-tests .....	34
2.1	Ré-identification des bactéries-tests multirésistantes.....	35
2.1.1	Repiquage des bactéries-tests.....	36
2.1.2	Coloration de Gram.....	36
2.1.3	Identification classique pour les Entérobactéries .....	36
2.1.3.1	Préparation des milieux de la galerie classique .....	36
2.1.3.2	Ensemencement des milieux et incubation .....	36
2.1.3.3	Lecture de la galerie classique.....	37
2.1.3.3.1	Mise en évidence de l'Uréase .....	37
2.1.3.3.2	Mise en évidence de la production d'indole.....	37
2.1.3.3.3	Fermentation de citrate .....	37
2.1.3.3.4	Fermentation de thiol de sulfate (H <sub>2</sub> S).....	37
2.1.3.3.5	Fermentation de lactose et glucose.....	37
2.1.3.3.6	Production de gaz.....	37
2.1.3.3.7	Fermentation du mannitol .....	37
2.1.3.3.8	Détermination de la mobilité .....	38



2.1.4	Antibiogramme en milieu gélosé-Méthode des disques .....	38
2.2	Préparation de l'inoculum .....	38
2.3	Ensemencement par écouvillonnage .....	38
2.4	Déposition des disques .....	38
2.5	Lecture .....	38
3	Mise en évidence de l'activité antimicrobienne en milieu solide .....	39
3.1	Criblage primaire des isolats d' <i>Actinomycètes</i> .....	39
4	Production de molécules antimicrobiennes sur milieu liquide.....	39
4.1	Cinétique de production des métabolites secondaires .....	39
4.2	Fermentation et extraction des métabolites secondaires.....	40
5	Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques.....	40
Chapitre II: Caractérisation taxonomique des isolats d' <i>Actinomycètes</i> sélectionnées.....		44
1	Etude morphologique, biochimique et physiologique des isolats .....	45
1.1	Caractérisation morphologique.....	45
1.2	Caractères micro-morphologiques.....	45
1.3	Caractérisation biochimique et physiologique .....	45
2	Identification moléculaire des isolats d' <i>Actinomycètes</i> .....	46
2.1	Extraction de l'ADN génomique.....	46
2.2	Amplification par PCR conventionnelle.....	46
2.3	Analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose .....	47
2.4	Séquençage et construction de l'arbre phylogénétique .....	47
Chapitre III : Mise en évidence de l'activité antioxydante et anticancéreuse des souches d' <i>Actinomycètes</i> sélectionnées.....		49
1	Propriétés antioxydantes .....	50
1.1	Dosage des poly-phénols totaux (Analyse quantitative) .....	50
1.2	Dosage de la teneur en flavonoïdes (analyse quantitative).....	50
1.3	Activités antioxydantes <i>in vitro</i> .....	50

1.3.1	Méthode de piégeage des radicaux libres (DPPH).....	50
1.3.2	Activité de piégeage des radicaux libres (ABTS) .....	51
1.3.3	Test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP) .....	51
2	Mise en évidence de l'activité anticancéreuse .....	51
2.1	Culture cellulaire et cytotoxicité.....	51
2.2	Evaluation de l'activité hémolytique par le test d'hémolyse.....	52
3	Analyse UV-visible des extraits organiques .....	53
Chapitre IV : Identification des molécules à activités biologiques (antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses), de l'extrait dichlorométanique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. SCJ OP101646.....		
		54
1	Analyse CPG-SM des extraits organiques .....	55
2	Analyse statistique.....	55
Résultats et Discussion.....		
		56
Chapitre I: Isolement et screening des isolats d'Actinomycètes pour leur activité antimicrobienne.....		
		57
1	Isolement des souches d' <i>Actinomycètes</i> .....	58
1.1	Analyses physico-chimiques des échantillons de sol .....	58
1.2	Isolement des souches d' <i>Actinomycètes</i> .....	63
1.3	Criblage des isolats d' <i>Actinomycètes</i> actifs .....	69
1.3.1	Criblage primaire en milieu solide .....	69
1.3.2	Criblage secondaire en milieu liquide .....	80
1.3.2.1	Cinétique de production de métabolites secondaires .....	98
1.3.2.2	Extraction des composés actifs et choix du solvant d'extraction .....	101
Chapitre II: Caractérisation taxonomique des isolats d'Actinomycètes sélectionnées.....		
		103
1	Caractéristiques taxonomiques des souches d' <i>Actinomycètes</i> actives .....	104
1.1	Etude morphologique des souches d' <i>Actinomycètes</i> .....	104
1.1.1	Caractéristiques culturelles.....	104
1.1.2	Caractères micro-morphologiques .....	110

1.2	Caractéristiques physiologiques, biochimiques et production des pigments mélanoides des isolats d' <i>Actinomycètes</i> actifs .....	114
1.2.1	Production de pigments mélanoides.....	114
1.2.2	Croissance à différentes valeurs de pH et de température .....	114
1.2.3	Tolérance au chlorure de Sodium (Na Cl) .....	115
1.2.4	Assimilation de la source de carbone .....	115
1.3	Analyse hiérarchique en clusters .....	118
1.4	Identification moléculaire et analyse phylogénétique des isolats d' <i>Actinomycètes</i> bioactifs .....	119
	<i>Streptomyces africanus</i> NBRC 101005 (T) (NR_112600.1).....	125
Chapitre III : Mise en évidence de l'activité antioxydante et anticancéreuse des souches d' <i>Actinomycètes</i> sélectionnées.....		
1	Propriétés antioxydantes .....	128
1.1	Teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits bruts.....	128
1.2	Activités antioxydantes <i>in vitro</i> par DPPH, ABTS et FRAP .....	129
1.3	Corrélation entre les teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes et les activités antioxydantes (ABTS, DPPH et FRAP). .....	133
2	Mise en évidence de l'activité anticancéreuse de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> .....	135
2.1	Cytotoxicité des extraits dichlorométhaniques sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468).....	135
2.2	Evaluation de la toxicité des 6 extraits dichlorométhaniques par test d'hémolyse <i>vis-à-vis</i> des cellules humaines normales (globules rouges (RBC)). .....	138
2.3	Evaluation de la toxicité des 6 extraits dichlorométhaniques par spectrophotomètre UV-vis à balayage .....	142
Chapitre IV : Identification des molécules à activités biologiques (antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses), de l'extrait dichlorométhanique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. SCJ OP101646.....		
	Conclusion générale et perspectives.....	156
	Références bibliographiques.....	174



## Liste des Abréviations

<b>ATBG</b>	Antibiogramme.
<b>ATB</b>	Antibiotique.
<b>ABTS</b>	L'acide 2,2'-azino-bis (3-éthylbenzothiazoline-6-sulphonique).
<b>ARNr</b>	Acide ribonucléique ribosomique.
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection.
<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique.
<b>ANOVA</b>	Analyse de la variance.
<b>BGN</b>	Bacille à Gram Négatif.
<b>BLAST</b>	Basic Local Alignment Search Tool.
<b>bp</b>	Paire de bases.
<b>BMR</b>	Bactéries multirésistantes.
<b>CLED</b>	Cystine- Lactose -Electrolyte -Déficient.
<b>CGP</b>	Cocci Gram Positif.
<b>CLSI</b>	Clinical and Laboratory Standards Institute.
<b>CCMM</b>	Collections Coordonnées Marocaines de Microorganismes.
<b>DO</b>	Densité optique.
<b>DPPH</b>	$\alpha$ , $\alpha$ -diphenyl- $\beta$ -picrylhydrazyl.
<b>DMSO</b>	Dimethylsulfoxyde.
<b>ECBU</b>	Examen Cytobactériologique des urines.
<b>ELISA</b>	Enzyme-linkedimmunosorbentassay.
<b>EAA</b>	Equivalent d'acide ascorbique.
<b>EQ</b>	Equivalent de quercétine.
<b>EDTA</b>	Ethylène Diamine Tétra-Acétique.
<b>EUCAST</b>	Comité européen sur les tests de sensibilité aux antimicrobiens.
<b>EBLSE</b>	Entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi.
<b>FRAP</b>	pouvoir antioxydant réducteur ferrique.
<b>CPG-SM</b>	Chromatographie en phase gaz couplée à la spectrométrie de masse.
<b>GYEA</b>	Glucose-extrait de levure-agar.
<b>g</b>	Gramme.
<b>ISP</b>	Milieu International <i>Streptomyces</i> Project.
<b>CI<sub>50</sub></b>	concentration inhibitrice médiane.
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharides.

<b>MHA</b>	Mueller –Hinton-Agar.
<b>MHB</b>	Mueller –Hinton-Bouillon.
<b>MEGA-X</b>	Molecular Evolutionary Genetics Analysis across.
<b>MEB ou Sem</b>	Microscope électronique à balayage.
<b>m/z</b>	rapport masse/charge.
<b>Mb</b>	Mégabase (1 million de nucléotides).
<b>MDA-MB-468</b>	Lignée cellulaire isolée d'une femme en 1977 et utilisée couramment dans la recherche sur le cancer du sein.
<b>M2</b>	Milieu amidon extrait de levure peptone.
<b>NCBI</b>	Centre national pour les informations biotechnologiques.
<b>NIST</b>	Institut national des normes et de la technologie.
<b>nm</b>	Nanomètre.
<b>OMS</b>	Organisation Mondiale de la Santé.
<b>PCD</b>	Programmed cell death(mort cellulaire programmée).
<b>PCR</b>	Polymérase Réaction en chaine.
<b>PBS</b>	Tampon phosphate salin.
<b>PU</b>	Prélèvement urétral.
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène.
<b>PDA</b>	Potato dextrose agar.
<b>PNs</b>	Produits naturels
<b>RPMI</b>	Roswell Park Memorial Institute medium (milieu utilisé en culture cellulaire).
<b>RBC</b>	Red Blood Cell (globules rouges).
<b>rpm</b>	Rotation par minutes.
<b>SCJ</b>	Souche Casablanca Jardin.
<b>sp</b>	Species (espèce).
<b>SD</b>	Standard Deviation (Ecart-type).
<b>SDS</b>	Sodium Dodecyl Sulfate.
<b>TR</b>	Temps de rétention.
<b>UFC</b>	Unité Formatrice de Colonie.
<b>UV</b>	Ultra violet.
<b>UV-Vis</b>	Ultra-violet –Visible.
<b>YEA</b>	Milieu extrait de levure-peptone-agar.

## Liste des Figures

<b>Figure 1.</b> Historique de la découverte des principales classes d'antibiotiques (Singh and Barrett, 2006). .....	8
<b>Figure 2.</b> Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Courvalin, 2008). .....	10
<b>Figure 3.</b> Images de microscopie électronique à balayage (MEB) représentant les types fragmentaires et permanents de mycélium des <i>Actinomycètes</i> . (A) Bactéries fragmentaires du genre <i>Nocardia</i> , (B) bactéries sporulantes du genre <i>Streptomyces</i> . Barre d'échelle : 1 $\mu\text{m}$ (Belyagoubi, 2014). .....	12
<b>Figure 4.</b> Morphologies des <i>Actinomycètes</i> observées dans les cultures en milieu liquide et sous agitation (Amanullah et al., 2000). .....	13
<b>Figure 5.</b> Écologie des <i>Actinomycètes</i> . Les <i>Actinomycètes</i> libres sont omniprésents dans les écosystèmes du sol, ainsi que dans les écosystèmes marins et d'eau douce (van der Meij et al., 2017). .....	17
<b>Figure 6 .</b> Applications biotechnologiques des <i>Actinomycètes</i> (Hopwood, 2007). .....	18
<b>Figure 7.</b> Structure du chromosome linéaire de <i>Streptomyces</i> (Kirby, 2011) avec modification .....	20
<b>Figure 8.</b> Cycle de vie de <i>Streptomyces</i> sur milieu solide (van der Meij et al., 2017). .....	21
<b>Figure 9.</b> Principaux résultats et dates de la découverte des antibiotiques (de Lima Procópio et al., 2012). .....	23
<b>Figure 10.</b> Quelques structures de métabolites secondaires naturels produits par le genre <i>Streptomyces</i> ayant des propriétés anticancéreuses (Haas and Sylvie, 2015). .....	28
<b>Figure 11.</b> Lieu d'échantillonnage des souches d' <i>Actinomycètes</i> appartenant à la région Fès-Meknès. La carte des sites d'échantillonnage a été récupérée sur Google Maps (Google Maps. Map Data ©2022. Récupéré de <a href="https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z">https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z</a> . .....	31
<b>Figure 12.</b> Lieu d'échantillonnage des souches <i>f<math>\phi</math>Cevkpqo{e<sup>3</sup>vgu</i> appartenant à la région Casablanca-Settat (JardinTitt Mellil). La carte du site d'échantillonnage a été récupérée sur Google Maps (Google Maps. Map Data ©2022. Récupéré de <a href="https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z">https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z</a> . .....	32
<b>Figure 13.</b> Schéma présentant la technique de culture sur lamelle (Manar IBRAHIMI et al., 2020). .....	45
<b>Figure 14.</b> Analyse des minéraux par microscope électronique à balayage (MEB). .....	60

<b>Figure 15.</b> Photos des isollements des Actinomycètes dans les quatre sites A, B, C et D sur les milieux Bennett, GLM et M2 (dilutions $10^{-2}$ , $10^{-3}$ et $10^{-4}$ ).....	66
<b>Figure 16.</b> Isolats d'Actinomycètes purs obtenus dans les quatre sites A, B, C et D sur milieu ISP2. ....	67
<b>Figure 17.</b> Aspect microscopiques des isolats d'Actinomycètes après coloration de Gram....	68
<b>Figure 18.</b> Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA).Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	71
<b>Figure 19.</b> Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA).Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	72
<b>Figure 20.</b> Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA).Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	73
<b>Figure 21.</b> Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA).Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	74
<b>Figure 22.</b> Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). ....	75
<b>Figure 23.</b> Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux (ISP1, ISP2, Bennett et GYEA). ....	76



<b>Figure 24.</b> Criblage primaire (Activité anti-candidose) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de culture (Bennet, ISP1, ISP2 et GYEA. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaison multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	77
<b>Figure 25.</b> Criblage primaire (Activité antifongique) par la méthode de la double couche sur milieu ISP2. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaison multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). .....	78
<b>Figure 26.</b> Criblage primaire (activité antifongique) par la méthode de la double couche sur quatre milieux (ISP1, ISP2, Bennett et GYEA). .....	79
<b>Figure 27.</b> Criblage secondaire (activité antibactérienne) par la méthode de diffusion en disques sur milieu MH en fonction des solvants d'extraction. ....	92
<b>Figure 28.</b> Criblage secondaire (activité antibactérienne) par la méthode de diffusion en disques sur milieu MH en fonction des solvants d'extraction. ....	93
<b>Figure 29.</b> Criblage secondaire (activité antifongique) par la méthode de diffusion en disques sur milieu Muller Hinton (MH). .....	<b>Erreur ! Signet non défini.</b>
<b>Figure 30.</b> Activité anti-candidose en fonction des solvants d'extraction. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, $p < 0,05$ ). Cycloheximide : Contrôle positif, Hex : Hexane, Dich : Dichlorométhane, AE : Acétate d'éthyle, But : Butanol, PR : Phase résiduelle. ....	96
<b>Figure 31.</b> Profil de résistance des bactéries cliniques multirésistantes (BMR). ....	97
<b>Figure 32.</b> Cinétique de l'évolution du pH et production de métabolites secondaires contre <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. ....	99
<b>Figure 33.</b> Cinétique de production métabolites secondaires par les souches d' <i>Actinomycètes</i> contre <i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579. ....	100
<b>Figure 34.</b> Extraction du surnageant de l'isolat SCJ par l'acétate d'éthyle (A), et par dichlorométhane (B). ....	102
<b>Figure 35.</b> Aspect morphologique des colonies des isolats de <i>Streptomyces</i> actifs .....	106
<b>Figure 36.</b> Observation en microscope optique (x40, et X100) des isolats d' <i>Actinomycètes</i> après une incubation de 14 jours à 28°C sur milieu ISP2. ....	111

<b>Figure 37.</b> Observation en microscope optique (x40, et X100) des isolats d' <i>Actinomycètes</i> après une incubation de 14 jours à 28 °C sur milieu ISP2. ....	112
<b>Figure 38.</b> Aspect des colonies des isolats d' <i>Actinomycètes</i> après dix jours de développement sur le milieu ISP1 (Vues au microscope optique, Grossissement= X400). (A) SCJ. (B) E23-2. (C) E23-3. (D) E23-4. (E) E23-8. (F) E23-9. (G) E23-10. (H) E23-11. (I) E24-9. (J) E25-9. (K) E25-11. (L) E25-12.....	113
<b>Figure 39.</b> Production de pigments brun-violet par l'isolat SCJ sur milieux de cultures GYEA et ISP2. ....	116
<b>Figure 40.</b> Dendrogramme montrant la relation évolutive des isolats d' <i>Actinomycètes</i> .....	118
<b>Figure 41.</b> Dosage de l'ADN extrait par Nanodrop 8000. ....	119
<b>Figure 42.</b> Electrophorèse sur gel d'agarose pour l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d' <i>Actinomycètes</i> . Les bandes ont été fractionnées par électrophorèse sur un gel d'agarose (1 %) et visualisées par le système de documentation photographique " G Box ". 1E (SCJ), 2E (E23-2), 3E (E23-3), 4E (E23-4), 5E (E23-8), 6E (E23-9), 7E (E23-10), 8E (E23-11), 9E (E24-9), 10E (E25-9), 11E (E25-11), 12E (E25-12). ....	120
<b>Figure 43.</b> Alignement des 12 séquences nucléotidiques par la méthode Muscle à l'aide d'un logiciel MEGA-X version 10.2.5. ....	121
<b>Figure 44.</b> Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats d' <i>Actinomycètes</i> . L'arbre phylogénétique basé sur le gène de l'ARNr 16S a été établi par méthode statistique (Neighbour-Joining Tree test), montrant les relations évolutives entre les 12 isolats d' <i>Actinomycètes</i> marqués par un cercle rouge et leurs taxons connus les plus proches. Chaque branche de l'arbre est associée à une valeur bootstrap (un pourcentage allant de 0 à 100 %) qui indique le nombre de fois où elle a été retrouvée lors des répétitions et détermine ainsi sa crédibilité, seules les valeurs (> 35 %) sont affichées. La barre (0,01) représente le nombre de substitutions par position nucléotidique (1 % de divergence entre les séquences). Les numéros d'accession GenBank sont indiqués entre parenthèses.....	124
<b>Figure 45.</b> CI <sub>50</sub> des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> dans le test ABTS.....	131
<b>Figure 46.</b> CI <sub>50</sub> des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> dans le test DPPH.....	132
<b>Figure 47.</b> Corrélation graphique de Pearson. ....	134

<b>Figure 48.</b> Elimination des cellules cancéreuses des plaques de culture cellulaire lors de la mort cellulaire. (L'élimination est caractérisée par la réduction de la quantité de coloration au cristal violet dans la culture). .....	136
<b>Figure 49.</b> Activité anticancéreuse des extraits dichloromethaniques de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain (MDA-MB-468) mesurée par le test au cristal violet. Le DMSO et Paclitaxel ont été utilisés comme contrôles négatifs et positifs, respectivement. Les données représentent la moyenne $\pm$ SD (n=2). *p < 0,05, **p < 0,01, ****p < 0,0001. ....	137
<b>Figure 50.</b> Evaluation de la cytotoxicité par test d'hémolyse 6 extraits dichlorométhaniques. ....	139
<b>Figure 51.</b> Image microscopique montrant l'effet de 6 extraits dichlorométhaniques, de PBS (contrôle négatif) et SDS (Contrôle positif) sur les globules rouges traitées avec différentes concentrations.....	140
<b>Figure 52.</b> Evaluation de l'activité hémolytique de 6 extraits dichlorométhanique par spectroscopie UV-vis. ....	141
<b>Figure 53.</b> Spectres UV-visible pour les 6 extraits bruts actifs dichlorométhaniques.....	143
<b>Figure 54.</b> CPG-SM de l'extrait brut dichlorométhaniques de la souche <i>Streptomyces sp.</i> SCJ OP101646 avec des pics indiquant la présence de composés bioactifs (selon la base de données NIST).....	149
<b>Figure 55.</b> Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche <i>Streptomyces sp.</i> SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST). ....	150
<b>Figure 56.</b> Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche <i>Streptomyces sp.</i> SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST). ....	151
<b>Figure 57.</b> Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche <i>Streptomyces sp.</i> SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST). ....	152
<b>Figure 58.</b> Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche <i>Streptomyces sp.</i> SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST). ....	153

**Figure 59.** Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST). ..... 154

## Liste des Tableaux

<b>Tableau 1.</b> Liste d'antibiotiques produits par différentes <i>Actinomycètes</i> avec une excellente application antimicrobienne (Hopwood, 2007).sp : Species (espèce). .....	25
<b>Tableau 2.</b> Mélange réactionnel pour 1 tube. ....	46
<b>Tableau 3.</b> Origine de collecte des microorganismes-tests. ....	35
<b>Tableau 4.</b> Profil de résistance des bactéries cliniques multirésistantes (BMR).....	42
<b>Tableau 5.</b> Analyse physico-chimique des échantillons de sol. ....	59
<b>Tableau 6.</b> Corrélation de Spearman entre les paramètres physico-chimiques du sol et le nombre total de <i>Streptomyces</i> (NTS) dans les quatre sites A, B, C et D. ....	62
<b>Tableau 7.</b> Nombre total des isolats de <i>Streptomyces</i> obtenus dans les quatre sites (A, B, C et D) en fonction de leurs milieux de culture. ....	64
<b>Tableau 8.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche SCJ) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	80
<b>Tableau 9.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E23-2) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	81
<b>Tableau 10.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E23-3) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	82
<b>Tableau 11.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E23-4) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	83
<b>Tableau 12.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E23-8) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	84
<b>Tableau 13.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E23-10) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	85
<b>Tableau 14.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E23-11) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	86
<b>Tableau 15 .</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E24-9) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	87
<b>Tableau 16.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E25-2) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	88
<b>Tableau 17.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E25-9) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	89
<b>Tableau 18.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E25-11) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	90

<b>Tableau 19.</b> Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de la souche E25-12) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction. ....	91
<b>Tableau 20.</b> Criblage secondaire (activité antifongique) par la méthode de diffusion en disques. ....	94
<b>Tableau 21.</b> Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats actifs de <i>Streptomyces</i> sur milieux ISP solides. ....	107
<b>Tableau 22.</b> Caractéristiques biochimiques et physiologiques des isolats d' <i>Actinomycètes</i> . ....	117
<b>Tableau 23.</b> Identification moléculaire des 12 isolats d' <i>Actinomycètes</i> sélectionnés basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S. ....	125
<b>Tableau 24.</b> Teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes de l'extrait dichlorométhanique de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> . ....	129
<b>Tableau 25.</b> Activité antioxydante des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> dans différents tests antioxydants (ABTS, DPPH et FRAP). ....	131
<b>Tableau 26.</b> Pourcentage d'inhibition de la croissance (mort cellulaire) de différents extraits dichloromethaniques de 6 isolats d' <i>Actinomycètes</i> contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain (MDA-MB-468) après 24h d'incubation en utilisant le test de cristal de violet. ....	138
<b>Tableau 27.</b> Composés volatils identifiés par CPG-SM à partir d'un extrait brut dichlorométhanique de la souche <i>Streptomyces</i> sp. SCJ OP101646. ....	147



# **INTRODUCTION GENERALE**



## Introduction générale

Les antibiotiques constituent un élément important dans les principales stratégies thérapeutiques appliquées en médecine moderne. En effet, ils ont eu un impact très important dans le traitement des infections causées par des micro-organismes pathogènes depuis la découverte du premier antibiotique (la Pénicilline) par Alexander Fleming en 1929. Ils ont entraîné également la plus forte réduction de morbi-mortalité liée aux maladies infectieuses (Wise, 2002).

Cependant, en raison de la vente libre et de la consommation abusive des antibiotiques, ainsi la prise de médicaments sans prescription médicale et leur utilisation intensive en agriculture ont conduit à l'émergence de nouveaux agents pathogènes qui ont acquis au cours de leurs développements une ou plusieurs résistances (résistances acquises) aux antibiotiques existants (Okeke et al., 1999; Ventola, 2015). Des preuves suggèrent que cette utilisation abusive de certaines classes d'antibiotiques peut augmenter le risque de cancer en diminuant le métabolisme phytochimique de la microflore intestinale (Kilkkinen et al., 2002; Rowland et al., 1999). En conséquence, les avantages des antibiotiques ont favorisé l'élimination des bactéries sensibles et la détection des plus résistantes, induisant ainsi l'émergence de la résistance bactérienne (Manar Ibrahim et al., 2020).

Le principal problème de la résistance aux antibiotiques est lié aux bactéries multirésistantes (BMR), c'est-à-dire les bactéries qui ont développé une résistance à au moins trois familles majeures d'antibiotiques (Muller, 2018). Le principal risque associé à ces bactéries multirésistantes est qu'elles engendrent des pannes thérapeutiques (Muller, 2018). La multi-résistance concerne les agents pathogènes ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter*), qui représente une menace mondiale pour la santé humaine et peut entraîner des infections graves difficiles à traiter, qui se traduisent par une maladie prolongée et, parfois, un risque accru de décès (Quinn et al., 2020). En effet, les infections bactériennes sont responsables d'environ 17 millions de décès par an, touchant principalement les enfants et les personnes âgées (Rudi et al., 2012). Les entérobactéries productrices de bêta-lactamases à spectre élargi (EBLSE) et de carbapénèmases sont les principales bactéries multirésistantes qui représentent une menace particulière dans les hôpitaux (Lorcy and Dubé, 2018).

Devant cette situation alarmante, la recherche de nouveaux composés bioactifs, en particulier des antibiotiques, sont nécessaires de toute urgence pour lutter contre l'évolution vers la multi-résistance aux médicaments (MRM). La découverte de nouveaux composés bioactifs est toujours nécessaire pour la prévention et / ou le traitement de ces maladies.

## Introduction générale

Les produits naturels produits par les bactéries ont été signalés comme la source la plus efficace pour la découverte de nouveaux médicaments puissants et à large spectre (Wright, 2012). Les différents microorganismes, principalement les bactéries et les champignons ont suscité une attention croissante dans la découverte de médicaments (Burja et al., 2001). Les molécules naturelles d'origine microbienne sont devenues les principales sources pour la production d'antibiotiques constamment utilisés (Liu et al., 2010; Milshteyn et al., 2014). En outre, il a été estimé que 45 % des métabolites secondaires sont d'origine microbienne (Chassagne et al., 2019).

Le sol contient diverses niches écologiques, dont les microbes produisent diverses molécules naturelles biologiquement actives contre un large éventail de pathogènes (Ganesan et al., 2017). Plus de 95 % des souches d'*Actinomycètes* isolées du sol, *Streptomyces* représentent le genre d'*Actinomycètes* le plus dominant (Barka et al., 2016a).

*Streptomyces* est un genre bactérien très important qui contient plus de 800 espèces (Al-Shaibani et al., 2021) et sont reconnus dans le monde entier comme une source inépuisable d'antibiotiques utilisés en thérapie humaine, environ 70 % des molécules actives sont d'origine microbienne (Kekuda et al., 2015; Labeda et al., 2012; Rudi et al., 2012). Les antibiotiques dérivés du genre *Streptomyces* jouent un rôle crucial dans le secteur médical. D'autre part, il a été souligné que ce genre produit la moitié de tous les antibiotiques utiles sur le plan thérapeutique (Jose et al., 2021). Certains rapports indiquent que les différents métabolites secondaires bioactifs de genre *Streptomyces* sont très utiles dans les domaines biomédical et pharmaceutique (Nayaka et al., 2020; Sharma et al., 2019).

A part les antibiotiques, les *Actinomycètes* sont reconnus pour la production d'agents anti-tumoraux, antioxydants, antiviraux, pesticides, insecticides et antiparasitaires qui se sont avérés efficaces contre une large gamme d'agents pathogènes et sont largement utilisés à des fins cliniques (Hui et al., 2021).

Pour s'adapter et survivre dans des environnements froids ou cryogéniques, certains microorganismes, dont *Streptomyces*, peuvent produire des métabolites secondaires de grand intérêt pour les applications biotechnologiques (LSooee et al., 2020). Dans ce contexte, nous avons orienté nos recherches vers de nouvelles molécules bioactives avec un large spectre d'activités extraites de *Streptomyces* sp. isolées dans des environnements froids. A notre connaissance, il n'y a pas d'informations disponibles concernant les activités biologiques et antimicrobiennes des souches de *Streptomyces* isolées dans des environnements froids au Maroc.

## Introduction générale

Par conséquent, les objectifs principaux de la présente étude étaient les suivants :

- 1) Isoler des souches d'*Actinomycètes* à partir des écosystèmes telluriques variés : écosystème naturel normal (jardin Titt Mellil appartenant à la région Casablanca-Settat au Maroc) et un écosystème froid (trois sites froids différents dans la région de Fès-Meknès, au Maroc (Sebt Jahjough El Hajeb, forêt d'Ain Vittel Ifrane, et forêt d'Azrou), et analyses physico-chimiques des échantillons de sol.
- 2) Effectuer un criblage primaire des isolats d'*Actinomycètes* pour leur activité antimicrobienne.
- 3) Effectuer une caractérisation morphologique, biochimique et physiologique, et une identification moléculaire par séquençage du gène de l'ARNr 16s des isolats d'*Actinomycètes* qui montreraient la plus forte activité antimicrobienne (bactéries non pathogènes et champignons phytopathogènes).
- 4) Déterminer l'activité antimicrobienne des extraits organiques de souche de *Streptomyces* contre certaines bactéries pathogènes multirésistantes (BMR) et champignons phytopathogènes.
- 5) Déterminer les composés phénoliques et flavonoïdes totaux dans les extraits organiques des 6 isolats présentant la plus forte activité antimicrobienne (bactéries et champignons pathogènes), ainsi que leur activité antioxydante *in vitro*.
- 6) Examiner l'activité inhibitrice des extraits organiques bruts des souches de *Streptomyces* sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468).
- 7) Evaluer la toxicité des extraits organiques par deux techniques : UV-visible et test d'hémolyse (globules rouge humains (RBC)).
- 8) Et enfin déterminer le profil des composés présents dans l'extrait dichlorométhanique de l'isolat le plus actif (activités antimicrobiennes, anticancéreuses et antioxydantes élevées) par analyse de chromatographie en phase gazeuse (CPG) couplée à la spectrométrie de masse (SM).

# **Revue bibliographique**

## Revue bibliographique

### 1 Les maladies infectieuses

#### 1.1 Les infections causées par les bactéries pathogènes

Les maladies infectieuses représentent la deuxième cause de mortalité humaine dans le monde (Guo et al., 2020). Les infections causées par les bactéries notamment les Entérobactéries, les Entérocoques, et les Gonocoques, sont la cause de maladies graves affectant les humains, comme par exemple les infections des voies urinaires (Mawufemo et al., 2020), les infections à *Neisseria gonorrhoeae* sous forme d'urétrite aiguë chez l'homme et la cervicite chez la femme (Gallay et al., 2008). Un autre agent pathogène, *Staphylococcus aureus*, figure parmi les principaux agents pathogènes responsables des infections hospitalières et communautaires et peut être la cause de nombreuses maladies infectieuses telles que les infections bénignes de la peau et des tissus mous, les endocardites infectieuses, les ostéomyélites, les bactériémies et les pneumonies mortelles (Humphreys, 2012; Lowy, 1998).

Le groupe d'agents pathogènes bactériens ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Enterobacter species*) est responsable de la majorité des infections nosocomiales et présente des menaces critiques en termes de pathogénèse, de transmission et de résistance (Behroozian et al., 2016). Malheureusement, ces microbes ESKAPE sont de plus en plus répandus dans les hôpitaux et de plus en plus résistants à un grand nombre d'agents antimicrobiens (Behroozian et al., 2016). Ils sont nommés ESKAPE car elles "échappent" (escape) à l'activité de tous les agents antimicrobiens disponibles et engendrent une morbidité et une mortalité importantes chez les patients infectés (Behroozian et al., 2016).

#### 1.2 Les infections causées par les champignons phytopathogènes

Comme les êtres humains, les plantes sont aussi susceptibles d'être infectées par diverses maladies. C'est le principal cas d'inhibition de leur croissance (Kumar, 2021). Ces maladies entraînent une baisse considérable de la production agricole, car la qualité et la quantité du rendement sont considérablement diminuées (Kumar, 2021). Parmi les champignons phytopathogènes, le genre *Fusarium* spp. a été signalé comme la principale cause de la maladie de la malformation du mangoier, qui se manifeste par une malformation des organes végétatifs et floraux, entraînant ainsi une réduction directe du rendement. (Kumar et al., 2016). Cette maladie a été enregistrée pour la première fois en Afrique de l'Ouest dans le sud du Sénégal en 2009 à Tandouk (Senghor et al., 2012). De plus, les espèces de *Fusarium* constituent une menace majeure pour la production d'agrumes dans le monde entier en provoquant des maladies graves, notamment la pourriture sèche des racines ou "Dry Root

## Revue bibliographique

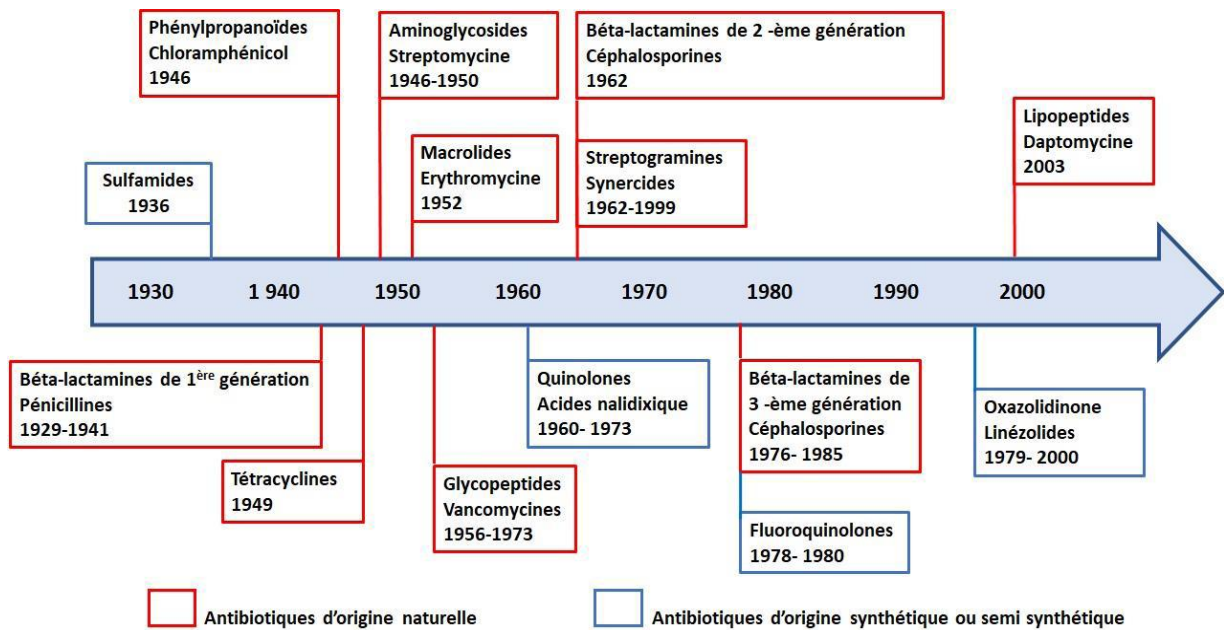
Rot" (DRR) (Al-Sadi et al., 2014; Liu et al., 2019). Le Maroc est connu comme l'un des principaux producteurs d'agrumes (fruits provenant des arbres de la famille des rutacées, (citrons, oranges, etc.)) et a augmenté la superficie réservée à leur production à 126.600 ha, qui ont été utilisés pour produire 2,6 millions de tonnes d'agrumes par an (Jaouad et al., 2020). Malgré sa large distribution et son importance économique, cette culture est fréquemment menacée, en particulier par les espèces de *Fusarium* (Guarnaccia and Crous, 2017).

## 2 Problématique de la résistance bactérienne

### 2.1 Histoire des antibiotiques

La découverte des antibiotiques a complètement révolutionné le domaine médical ; leur utilisation a débuté avec la découverte de la Pénicilline par Alexander Fleming en 1929 et la démonstration de l'activité antibactérienne *in vivo* par Florey et Chain en 1938 (Ibrahimi et al., 2020), qui marquera l'entrée dans la médecine moderne. L'utilisation des antibiotiques a permis de diminuer ou de supprimer la mortalité liée à des maladies infectieuses causées par les bactéries (Lode, 2010). Ultérieurement, de nombreuses autres molécules d'antibiotiques ont été découvertes (**Figure 1**). Selon Coates et al., (2011), la découverte de nouvelles classes d'antibiotiques a baissé à la fin de 1962. Cette situation a été associée à une augmentation de la consommation de ces molécules pour la santé humaine, l'agriculture, et pour l'élevage de poissons et de fruits de mer (Organisation mondiale de la santé, 2016). En raison de cette utilisation abusive, répétée et non raisonnée, l'efficacité des antibiotiques contre les bactéries a été compromise, ce qui a entraîné l'évolution des bactéries vers la résistance conduisant fréquemment à des échecs thérapeutiques (Courvalin, 2008). En effet, les bactéries se sont adaptées et ont développées de nombreux mécanismes de résistance qui leur permettent de survivre même en présence d'un antibiotique.

## Revue bibliographique



**Figure 1.** Historique de la découverte des principales classes d'antibiotiques (Singh and Barrett, 2006).

### 2.2 Résistance bactérienne

Dès le début de l'utilisation de la Pénicilline contre les bactéries, en 1940, Abraham and Chain, ont prouvé la résistance à cet antibiotique chez *E. coli*. En effet, on peut définir les conditions d'activité d'une molécule contre une bactérie comme suit :

- entrer dans la bactérie,
- ne pas être inactivée,
- se lier à la cible.

A l'opposé de ces conditions d'activité, nous pouvons imaginer schématiquement les conditions de résistance de la bactérie aux antibiotiques :

- ne pas accumuler l'antibiotique (l'imperméabilité),
- inactiver l'antibiotique,
- changer la cible,

Une bactérie qui est résistante à un antibiotique ou à une famille d'antibiotiques peut présenter un ou plusieurs mécanismes. Il existe deux types de résistance bactérienne aux antibiotiques : la résistance naturelle et la résistance acquise.

## **Revue bibliographique**

### **2.2.1 Résistance bactérienne intrinsèque (ou naturelle ou insensibilité)**

Certaines bactéries peuvent être naturellement résistantes à une ou plusieurs classes d'antibiotiques. La résistance naturelle des bactéries est la résistance que l'on trouve normalement chez toutes les souches d'une même espèce ou d'un même genre bactérien. Par exemple, le bacille de la tuberculose ne présente une sensibilité qu'à quelques antibiotiques spécifiques (Ramaswamy and Musser, 1998).

### **2.2.2 Résistance bactérienne acquise**

C'est un caractère qui permet à certaines bactéries d'acquérir une résistance à la pression des antibiotiques au cours de son développement ce qui lui permet de supporter une concentration d'antibiotiques plus élevée que celle inhibant l'activité des souches sauvages de la même espèce (Nikaido, 2009; Tenover, 2006). De telles résistances existent uniquement chez certaines souches de l'espèce. Un exemple est la résistance acquise par *E. coli* aux Pénicillines (Amoxicilline et à la Ticarcilline) (Tenover, 2006).

### **2.3 Origine de l'émergence des résistances acquises**

La bactérie peut acquérir le gène de résistance par divers mécanismes, notamment des mutations génétiques qui apparaissent sur le chromosome ou sur le plasmide (Courvalin, 2008; Davies and Davies, 2010). On parlera de résistances d'origine chromosomique et de résistance d'origine plasmidique. La résistance chromosomique ne peut être transférée que d'une cellule mère à une cellule fille, et donc au sein de la même espèce. Dans le cas de la résistance plasmidique, les plasmides peuvent être transférés par conjugaison ou transformation à une autre bactérie, mais pas nécessairement de la même espèce. Ce transfert génétique se traduit par le transfert des gènes de résistance portés par ces plasmides (Courvalin, 2008; Davies and Davies, 2010).

### **2.4 Evolution des bactéries multirésistantes aux antibiotiques**

Une souche est dite résistante lorsqu'elle tolère une concentration d'antibiotique supérieure à celle qui inhibe les autres souches de la même espèce. Avec la fin du 20<sup>ème</sup> siècle, les bactéries multirésistantes ont évolué et sont apparues. Ces bactéries ne sont sensibles qu'à un petit nombre d'antibiotiques. Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), les bactéries multirésistantes sont responsables du décès de 33 000 personnes en Europe chaque année, avec des conséquences financières s'élevant à un milliard d'euros en Europe (Cassini et al., 2019).

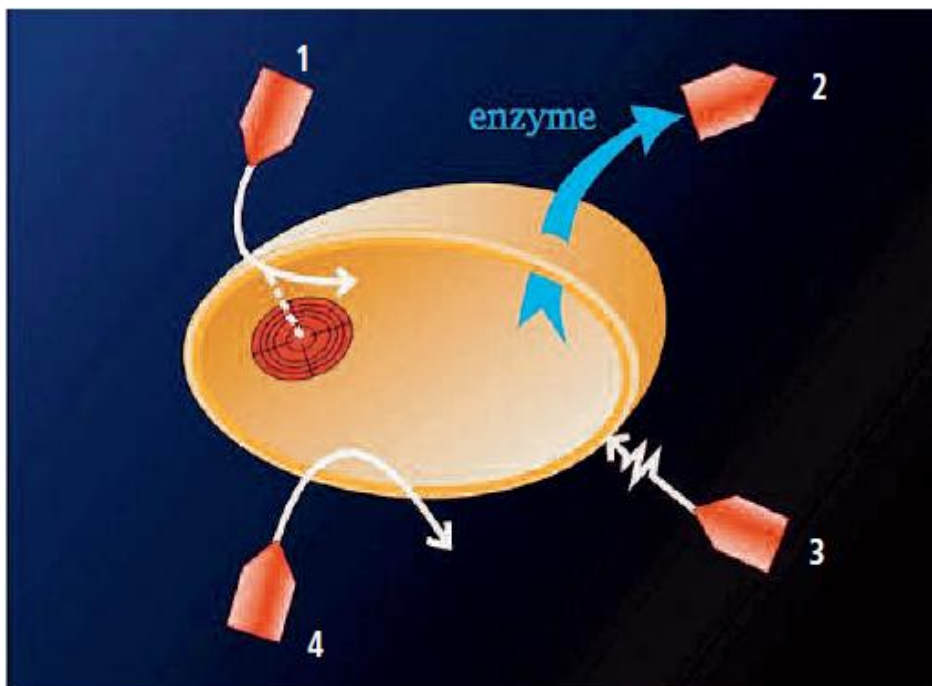


## Revue bibliographique

### 2.5 Mécanisme de résistance

En réponse de l'utilisation extensive et fréquemment abusive des antibiotiques, les bactéries ont développé, à la fois sur le plan biochimique et génétique une résistance aux médicaments antibactériens par le biais de divers mécanismes (Tenover, 2006). Du point de vue biochimique, les bactéries ont développé quatre grands principaux mécanismes d'acquisition de la résistance (Courvalin, 2008) (**Figure 2**) à savoir :1) le changement de la cible, qui conduit à une perte d'affinité de l'antibiotique pour cette dernière ; 2) la production d'une enzyme qui inactive l'antibiotique ; 3) l'imperméabilité, qui est marquée par une réduction du diamètre des porines (pores à la surface de la membrane externe) chez les bactéries à Gram négatif (BGN) ; 4) l'efflux des antibiotiques hors la cellule par des pompes dépendant de l'énergie. Le point commun entre ces différents mécanismes de résistance est d'empêcher l'interaction de l'antibiotique avec sa cible.

Du point de vue génétique, la résistance peut être acquise par deux voies entièrement distinctes à savoir des mutations dans le génome, et nous parlerons alors de transmission verticale aux descendants, et l'acquisition d'informations génétiques étrangères, issues d'autres bactéries, par transfert horizontal (Courvalin, 2008).



**Figure 2.** Principaux mécanismes de résistance aux antibiotiques (Courvalin, 2008).

## Revue bibliographique

### 3 Généralité sur les *Actinomycètes*

#### 3.1 Historique

D'après Waksman S.A en 1959, Ferdinand Cohn (considéré comme fondateur de la microbiologie) fut le premier à isoler les *Actinomycètes* à partir des ressources humaines en 1875. L'histoire des *Actinomycètes* a été divisée en quatre grandes périodes par ce même auteur. La première est la découverte de leur rôle en pathologie, qui a lieu entre 1874 et 1890. La deuxième période, de 1900 à 1919, est associée à la découverte et à l'étude des *Actinomycètes* du sol, illustrée par les travaux de Kraisky, Cohn, Waksman et Curtis. Ensuite, de 1919 à 1940, une meilleure compréhension des microorganismes a été acquise grâce aux recherches de Waksman, Lieske et Krassilinkov. La période la plus récente, de 1940 jusqu'à aujourd'hui, est consacrée aux antibiotiques produits par les *Actinobactéries*. En 1940, après la découverte du premier antibiotique l'Actinomycine par Waksman, les *Actinomycètes* tiennent une très grande importance dans le domaine de la biotechnologie des antibiotiques. En effet, 75 % des antibiotiques connus, appartiennent aux *Actinomycètes* et plus particulièrement du genre *Streptomyces*. (Anderson and Wellington, 2001).

#### 3.2 Définition et caractéristique générale

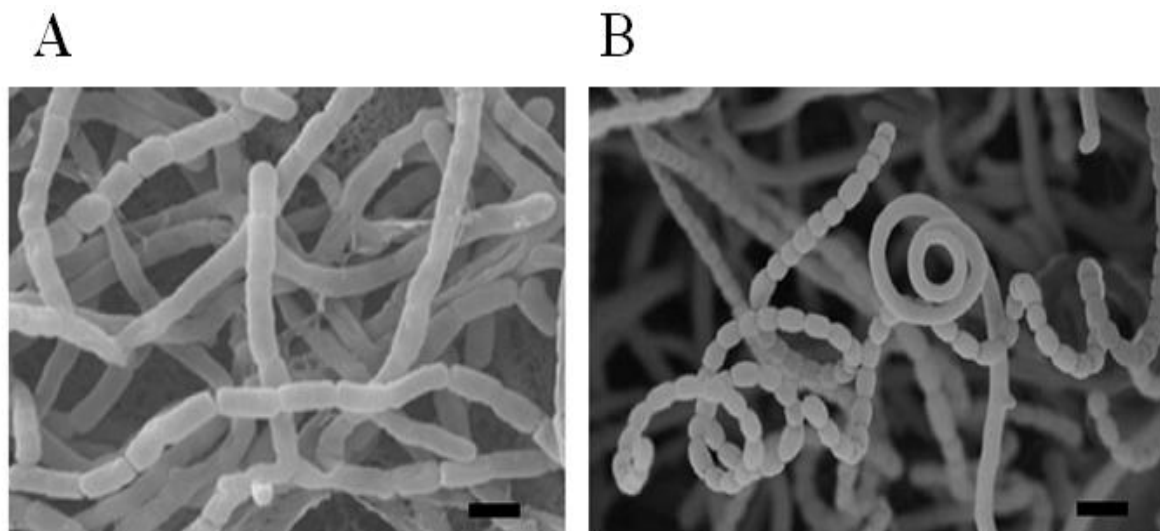
En étymologie, le terme *Actinomycète* vient des mots grecs "Aktis" qui signifie "rayon" et "mykes" qui signifie "champignons à rayons" ou "champignons rayonnants" (Harir, 2018). Traditionnellement, les *Actinomycètes* sont considérés comme un groupe intermédiaire entre les bactéries et les champignons. Elles sont actuellement classées parmi les organismes procaryotes qui appartiennent à l'ordre des *Actinomycétales* (Harir, 2018). Leurs propriétés chimiques, physiologiques et immunologiques les placent parmi les procaryotes (Harir, 2018). Dans le manuel de Bergey (éditions 1989, 1994 et 2004), cet ordre a été défini comme une bactérie à Gram positif et à structure végétative de type mycélien dont la croissance donne lieu à des colonies constituées d'hyphes, c'est à dire des filaments qui irradiant, par croissance centrifuge, tout autour du microorganisme qui leur a donné naissance. En plus, les *Actinomycètes* sont des bactéries sporulées formant des filaments minces et ramifiés, et ont possédant une séquence génomique (ADN) relativement importante avec forte teneur en Guanine et en Cytosine (G+C) (Barka et al., 2016a; Quinn et al., 2020). Physiologiquement et écologiquement, la plupart des *Actinomycètes* sont aérobies, mais il existe des exceptions, elles peuvent également être hétérotrophes ou chimioautotrophes, mais la plupart sont chimiohétérotrophes et capables d'utiliser une large gamme de sources nutritionnelles, y compris divers complexes de polysaccharides (Lechevalier and Lechevalier, 1965). La

## Revue bibliographique

majorité des *Actinomycètes* sont neutrophiles. Elles croissent dans un intervalle de pH entre 7 et 11 avec croissance optimale à pH neutre ou légèrement alcalin (entre 7 et 8) (Basilio et al., 2003). Elles sont particulièrement sensibles à l'acidité (Davet, 1996a). La majorité des *Actinomycètes* sont des organismes qui vivent librement et qui sont largement distribués dans les écosystèmes terrestres et aquatiques (y compris marins) (Macagnan et al., 2006).

### 3.3 Morphologie des *Actinomycètes*

Deux groupes morphologiques peuvent être distingués, le premier présente des caractéristiques morphologiques spécifiques avec des filaments ramifiés en masse (Mycélium) (Manar Ibrahim et al., 2020). Le deuxième groupe est particulièrement plus complexe que le premier, ils comprennent des bacilles et des coccobacilles tels que *Rhodococcus* et *Mycobacterium* (Lechevalier, 1985). En termes de caractéristiques morphologiques, le groupe des *Actinomycètes* comprend des espèces ayant un mycélium rudimentaire ou même inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), d'autres ayant un mycélium fugace et fragmentaire (certaines *Nocardia*), ainsi que des espèces ayant un mycélium développé et persistant, comme c'est le cas du genre *Streptomyces*. La **Figure 3** représente les mycéliums fragmentaires et permanents.



**Figure 3.** Images de microscopie électronique à balayage (MEB) représentant les types fragmentaires et permanents de mycélium des *Actinomycètes*. (A) Bactéries fragmentaires du genre *Nocardia*, (B) bactéries sporulantes du genre *Streptomyces*. Barre d'échelle : 1 µm

(Belyagoubi, 2014).

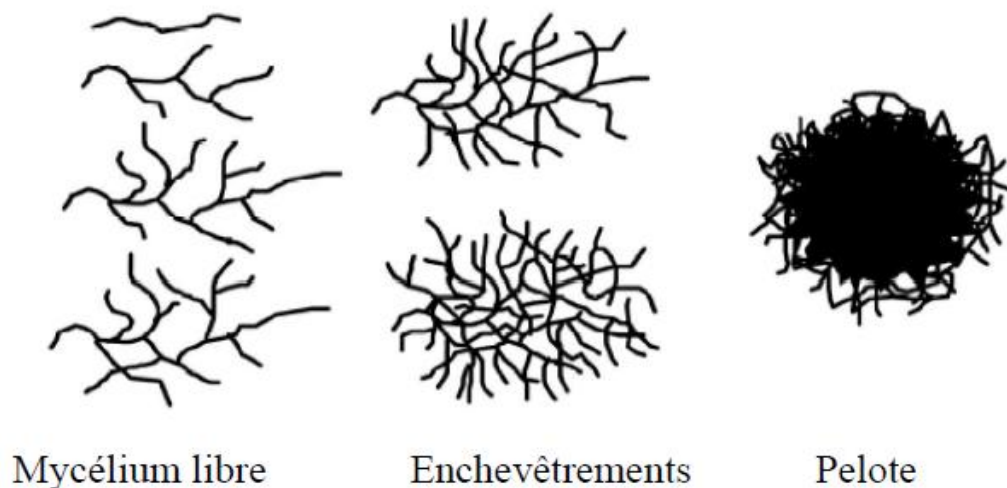
## Revue bibliographique

En ce qui concerne la forme du mycélium, on distingue : ceux qui ne forment qu'un mycélium " de base " ou mycélium végétatif, appelé aussi mycélium de substrat, qui se développe à la surface et sur le milieu de culture (Prescott et al., 2003) et ceux qui développent un mycélium aérien à partir du mycélium de base (Smaoui, 2010).

Dans une culture liquide sans agitation, les hyphes formés par les *Actinomycètes* après la germination des spores remontent à la surface pour se développer au contact de l'air (van Keulen et al., 2003). Par contre, dans un milieu liquide avec agitation, ni le mycélium aérien ni les spores ne se forment.

Sur le milieu liquide et en contact de l'air, les *Streptomyces* commencent leur développement pour la formation des filaments libres qui se ramifient et s'assemblent pour former des agrégats (Amanullah et al., 2000). Ainsi deux catégories de filaments peuvent être distinguées (**Figure 4**) :

- Pellet : un conglomérat de plusieurs hyphes dont les diamètres peuvent varier de plusieurs micromètres à plusieurs millimètres.
- Hyphes dispersés : existent sous deux formes : “librement dispersés” et “amas de mycélium ou agglutinés” (Cox et al., 1998).



**Figure 4.** Morphologies des *Actinomycètes* observées dans les cultures en milieu liquide et sous agitation (Amanullah et al., 2000).

## Revue bibliographique

### 3.4 Biologie des *Actinomycètes*

La majorité des *Actinomycètes*, notamment les *Streptomyces*, sont des saprophytes vivant dans le sol qui passent la majorité de leur cycle de vie sous forme de spores semi-dormantes, en particulier dans les environnements pauvres en nutriments (Mayfield et al., 1972).

Les *Actinomycètes* sont présents dans les sols, l'eau douce et salée et l'air. Ils sont plus abondants dans les sols que dans les autres environnements, notamment dans les sols alcalins et les sols riches en matière organique, où ils constituent une part importante de la population microbienne (Goodfellow and Williams, 1983). Les *Actinomycètes* peuvent être trouvées à la surface du sol et à des profondeurs de plus de 2 m sous la surface du sol (Goodfellow and Williams, 1983).

La densité de population des *Actinomycètes* est influencée par leur habitat et les conditions climatiques locales (Goodfellow and Williams, 1983). Elles sont généralement présentes à des densités de l'ordre de  $10^6$  à  $10^9$  cellules par gramme de sol (Goodfellow and Williams, 1983). Ainsi, les populations du sol sont dominées par le genre *Streptomyces*, qui représente plus de 95 % des souches d'*Actinomycètes* isolées dans le sol (Barka et al., 2016a). D'autres facteurs, tels que la température, le pH et l'humidité du sol, ont également un impact important sur la croissance des *Actinomycètes* (Edwards, 1993). La plupart des espèces d'*Actinomycètes* sont mésophiles et leur température de croissance optimale se situe entre 25 et 30°C (Barka et al., 2016a). Cependant, les *Actinomycètes* thermophiles peuvent se développer à des températures variaient de 50 à 60°C (Edwards, 1993).

### 3.5 Taxonomie des *Actinomycètes*

Les caractéristiques morphologiques, physiologiques, écologiques et moléculaires sont les principales caractéristiques utilisées pour la classification et l'identification des micro-organismes (Willey et al., 2010). En taxonomie microbienne, l'espèce est le groupe taxonomique de base. Une étape cruciale dans la recherche de nouveaux antibiotiques est la caractérisation taxonomique des *Actinomycètes* qui produisent des antibiotiques (Van Hop et al., 2011). Avec le développement des connaissances, la taxonomie des *Actinomycètes* a fortement progressé dans le temps.

En effet, en 1943, Waksman et Henrici ont suggéré que la classification des *Actinomycètes* devait être basée sur les caractères macro- et micro-morphologiques relatifs à la présence et à

## Revue bibliographique

la disposition des hyphes ou du mycélium aérien dans le substrat, à la formation des spores, à leur nombre, à leur mobilité, à leur forme, à leur position sur les hyphes et à la présence de sporanges, ce qui permettait de distinguer les différents genres.

La deuxième période, débutée dans les années 1960, a connu le développement de la chimiotaxonomie basée sur la composition de la paroi cellulaire telle que les acides aminés (BECKER et al., 1964), les sucres (Mary P. Lechevalier and Hubert Lechevalier, 1970), les phospholipides membranaires (Collins et al., 1982). L'étude de la composition de la paroi cellulaire pourrait être très utile pour identifier les souches qui sont morphologiquement intermédiaires comme par exemple les *Nocardiae* et les *Streptomyces* (Becker et al., 1964).

La troisième période, débutée dans les années 1970, a été marquée par l'émergence de la taxonomie numérique avec le développement des dendrogrammes qui ont apporté beaucoup de clarté à l'aide de logiciels appropriés (Grund and Kroppenstedt, 1990). ). La taxonomie numérique est basée sur des tests physiologiques tels que : pH, température, assimilation des sucres carbonés et azotés, tolérance au NaCl, etc. et des tests biochimiques tels que : dégradation de substrats comme la gélatine, l'amidon, etc (Grund and Kroppenstedt, 1990).

Selon la classification de Murray qu'on retrouve dans le Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986, 1989), les *Actinomycètes* appartiennent au règne des procaryotes, à la division des *Firmicutes* (bactéries à Gram positif), et à la classe des *Thallobacteria* (bactéries à gram positif filamenteuses) contenant l'ordre des *Actinomycetales*.

La taxonomie classique basée sur les caractéristiques phénotypiques, comme les propriétés morphologiques, chimio-taxonomiques et physiologiques n'est pas été pris en compte par plusieurs chercheurs, car elle est inadéquate pour distinguer les différentes espèces de nombreux genres (Babalola et al., 2009; Hozzein and Goodfellow, 2011). Par ailleurs, du fait de leur diversité, des approches phylogénétiques et moléculaires sont devenues indispensables pour différencier entre les *Actinomycètes* (Babalola et al., 2009; Hozzein and Goodfellow, 2011). Plusieurs techniques ont été utilisées pour tracer toute la phylogénie des *Actinomycètes*, notamment l'hybridation ADN-ADN, le séquençage de l'ARN 16S, etc. Zhi et al., en 2009 ont rapporté que les phylogénies et l'identification des espèces sont actuellement fréquemment dérivées de l'ARNr 16S et de l'utilisation des réactions en chaîne par polymérase (PCR) pour les analyses de séquences (Zhi et al., 2009).

## Revue bibliographique

### 3.6 Ecologie des *Actinomycètes*

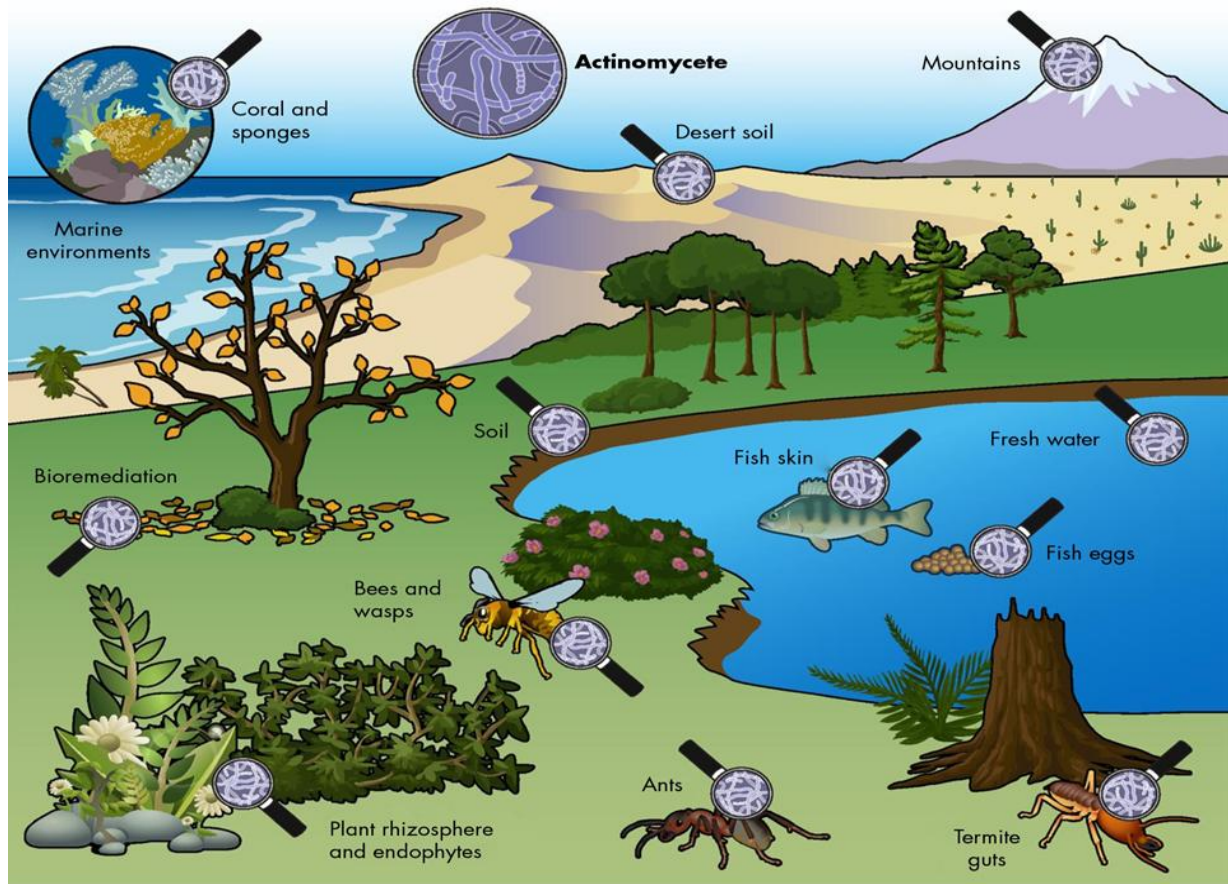
Les *Actinomycètes* libres sont omniprésents, et ont été isolés dans divers endroits, y compris, les écosystèmes du sol, l'eau douce, les sources chaudes marines, les sites miniers, ainsi que dans des environnements extrêmes (**Figure 5**). Les *Actinomycètes* ont un rôle écologique important dans le renouvellement de la matière organique. De nombreux *Actinomycètes* ont évolué pour vivre en symbiose avec des plantes, des champignons, des insectes et des animaux. La majorité de interactions *Actinomycètes*-hôtes sont bénéfiques, car les *Actinomycètes* produisant des produits naturels (PNs) qui permettent à leur hôte de se protéger contre les pathogènes ou les parasites, ou des enzymes qui dégradent les polymères naturels résilients comme la lignocellulose (van der Meij et al., 2017).

Les *Actinomycètes* sont beaucoup plus abondants dans le sol que dans les autres milieux écologiques, (eaux douces ou salines, l'air, etc), notamment dans les sols alcalins et les sols riches en matières organiques (van der Meij et al., 2017). Leur répartition au niveau du sol est étendue de la surface à plus de deux mètres de profondeur (Breton. et al.,1989). Les *Actinomycètes* exercent un rôle écologique important dans le recyclage et la minéralisation des nutriments dans le sol. Ils permettent de recycler les nutriments en dégradant une quantité importante de matières organiques présentes dans le sol. Ils favorisent la croissance des plantes en aidant à la fixation de l'azote, à la solubilisation des nutriments, à l'immobilisation des nutriments, à la production de sidérophores, à la lutte biologique et au maintien de la structure du sol (Gil et al., 2009; T. R. P. Kekuda et al., 2015; Macagnan et al., 2008).

Le genre *Streptomyces* est connu comme étant le producteur du plus grand nombre d'antibiotiques, soit 80 % des antibiotiques sécrétés par ce genre d'*Actinomycètes* (Aouiche et al., 2012).

Le nombre et la variété des *Actinomycètes* présents dans un échantillon de sol sont influencés par des facteurs tels que, la localisation géographique, la température du sol, le type de sol, le pH du sol, la teneur en matières organiques, les activités agricoles, l'aération, la disponibilité des nutriments, la teneur en humidité et la végétation du sol (Arifuzzaman et al., 2010).

Lee et Hwang, en 2002 ont rapporté que la plupart des *Actinomycètes* se comporte comme des bactéries neutrophiles. Leur croissance est meilleure à pH compris entre 6 et 9, avec un maximum autour de la neutralité. Elles sont particulièrement sensibles aux pH acides d'après Davet, (1996b).



**Figure 5.** Écologie des *Actinomycètes*. Les *Actinomycètes* libres sont omniprésents dans les écosystèmes du sol, ainsi que dans les écosystèmes marins et d'eau douce (van der Meij et al., 2017).

### 3.7 Cycle de développement des *Actinomycètes*

Les *Actinomycètes* présentent un cycle de développement semblable à celui de certains champignons, mais leur structure procaryotique, sans noyau distinct, les a fait classer parmi les bactéries. Ce cycle débute par la germination d'une spore donnant naissance à un mycélium primaire appelé mycélium de substrat, formé d'hyphes non séptées et plurinucléés, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Sur ce mycélium primaire, se développera ensuite un mycélium secondaire appelé mycélium aérien. Les extrémités des hyphes aériens se cloisonnent et se différencient pour former des chaînes spores uninucléées (Flårdh et al., 2009) (**Figure 8**). Du point de vue morphologique, les hyphes aériens sont plus épais et beaucoup moins ramifiés que les hyphes du substrat, ils sont en général pigmentés et enfermés dans une enveloppe externe hydrophobe (Prescott et al., 2003).



### 3.8 Application des *Actinomycètes*

Les *Actinomycètes* sont réputés pour leur production de métabolites primaires et secondaires qui ont des applications importantes dans divers domaines (**Figure 6**). Elles représentent également une source prometteuse d'une large gamme d'enzymes importantes, qui sont produites à l'échelle industrielle (Hopwood, 2007). Une grande partie des antibiotiques existents sur le marché sont obtenus à partir des *Actinomycètes*. Ils produisent des inhibiteurs d'enzymes qui peuvent être utilisés pour traiter le cancer ainsi que des immunomodulateurs qui renforcent la réaction immunitaire (Hopwood, 2007). Elles peuvent dégrader une grande variété d'hydrocarbures, de pesticides et de composés aliphatiques et aromatiques (Hopwood, 2007). Les *Actinomycètes* sont également utiles en biotechnologie végétale, car certaines souches ont une activité antagoniste contre les agents phyto-pathogènes. En raison de leur potentialité métabolique, les *Actinomycètes* offrent un domaine de recherche important (Hopwood, 2007).



**Figure 6.** Applications biotechnologiques des *Actinomycètes*(Hopwood, 2007).

## Revue bibliographique

### 3.8.1 Le genre *Streptomyces*

#### 3.8.1.1 Classification et caractéristiques générales

Le genre *Streptomyces* a été nommé au début des années 1940, sur la base des caractéristiques physicochimiques de la membrane cellulaire (Waksman and Henrici, 1943). Le genre *Streptomyces* appartient à l'embranchement des *Actinobactéries* et au groupe des *Actinomycètes*. C'est un genre très diversifié comptant environ 600 espèces et responsable de la production de la moitié de tous les antibiotiques connus (Labeda et al., 2012). Longtemps considéré comme un intermédiaire entre les bactéries et les champignons. La niche écologique naturelle du genre *Streptomyces* est principalement tellurique, cependant quelques espèces ont été observés en milieu aquatiques et leur apparition daterait d'environ 400 millions d'années (Chater, 2016).

Les bactéries du genre *Streptomyces* sont des bactéries à Gram positif, immobiles, aérobies strictes, chimio-hétérotrophes qui ont la particularité d'être sporulantes (Jean-noël Lorenzi, 2020). Elles se développent dans divers endroits, avec une forme filamenteuse qui ressemble à celle des champignons. La différenciation morphologique des *Streptomyces* implique la formation d'une couche d'hyphes qui peut se différencier en une chaîne de spores. Ce processus est exceptionnel parmi les organismes à Gram positif et nécessite la mise en place d'un métabolisme spécialisé et coordonné. La propriété la plus intéressante des *Streptomyces* est leur capacité à produire des métabolites secondaires bioactifs tels que des antifongiques, des antiviraux, des anti-tumoraux, des antihypertenseurs, et surtout des antibiotiques et des immunosuppresseurs. (Omura et al., 2001; Khan et al., 2011; Patzer and Braun, 2010). Une autre caractéristique du genre est son développement multicellulaire complexe, dans lequel les spores en germination forment des hyphes, avec un mycélium aérien multi-nucléaire, qui forme des septa à intervalles réguliers, créant une chaîne de spores non nucléées (Ohnishi et al., 2008). En outre, plus de 95 % des souches d'*Actinomycètes* ont été isolées du sol et *Streptomyces* sp. représente le genre le plus dominant (Barka et al., 2016b) .

Les bactéries de genre *Streptomyces* sont reconnues comme des producteurs potentiels de métabolites secondaires, notamment les antibiotiques, anticancéreux, antioxydants, antimicrobiens et immunosuppresseurs (Tanaka and Omura, 1990). La grande importance attribuée aux *Streptomyces* est partiellement expliquée par le fait qu'ils font partie des microorganismes du sol les plus nombreux et les plus polyvalents, en raison de leur taux élevé de production de métabolites et de processus de biotransformation, de leur capacité à dégrader

## Revue bibliographique

la lignocellulose et la chitine, et de leur rôle fondamental dans les cycles biologiques de la matière organique (Bentley et al., 2002).

### 3.8.1.2 Structure du chromosome linéaire de *Streptomyces*

Du point de vue génétique, les *Streptomyces* sont caractérisés par un grand chromosome linéaire mesurant en moyenne 8,4 Mb (allant de 6 à 12 Mb selon les espèces) sur lequel les gènes sont très instables, avec de nombreuses régions d'amplification et de délétion découvertes et présentent un taux élevé de bases guanine (G) et cytosine (C) (Chater, 2016; Dynamique et Génomique, 2020). En plus du chromosome linéaire, les *Streptomyces* peuvent avoir des plasmides (environ 7 plasmides pour *Streptomyces autolyticus*) circulants et/ou linéaires (Chater, 2016; Dynamique and Génomique, 2020).

En ce qui concerne la structure du chromosome des *Streptomyces* (Figure 7), on peut remarquer cinq régions distinctes : la région centrale qui comprend des gènes conservés chez les *Streptomyces*, et qui peut être subdivisée en région centrale avec des gènes du métabolisme primaire, délimitée d'un côté par une région spécifique aux *Actinomycètes* contenant des gènes communs à l'ordre des *Actinomycetales*, et de l'autre par une région spécifique aux *Streptomyces* (Kirby, 2011). Les zones les plus excentriques du chromosome de *Streptomyces* sont appelées les bras. Les groupes de gènes associés à la production des métabolites secondaires sont généralement au nombre d'une trentaine par espèce, et sont localisés préférentiellement dans les bras. Ces gènes sont très variables non seulement entre les espèces, mais aussi entre les souches d'une même espèce.

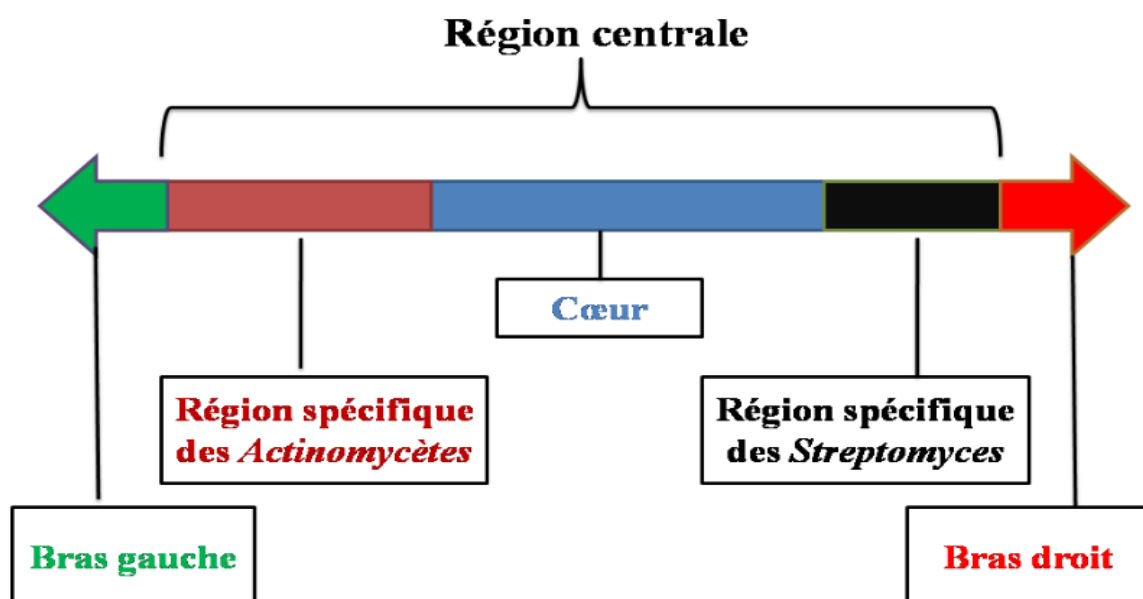
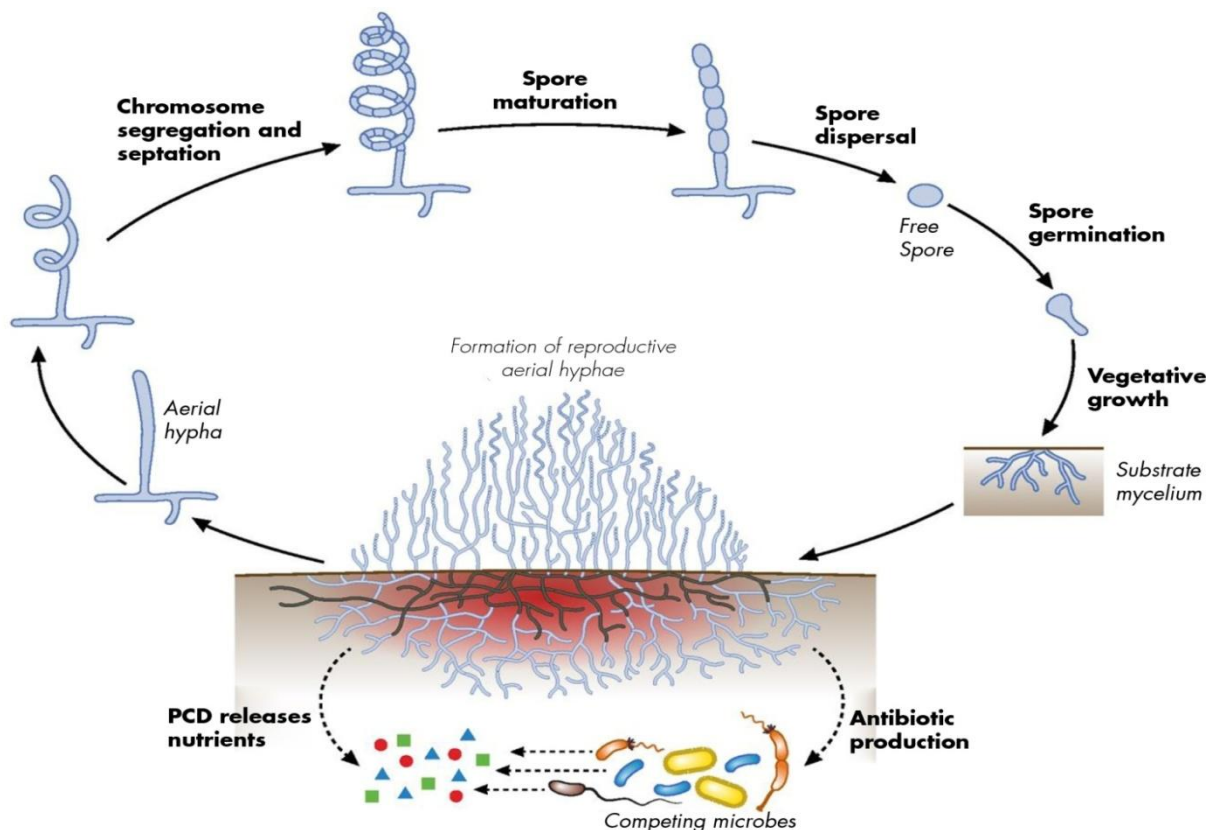


Figure 7. Structure du chromosome linéaire de *Streptomyces* (Kirby, 2011) avec modification.

### 3.8.1.3 Cycle de vie des *Streptomyces*

Les *Streptomyces* sont des bactéries aérobies ubiquistes du sol, qui ont un mode de vie filamenteux inhabituel, et qui se reproduisent par sporulation (**Figure 8**) (van der Meij et al., 2017). Elles présentent un cycle de développement particulier. Sur un milieu de culture solide, lorsqu'une spore trouve des conditions favorables de température, de nutriment, de l'humidité...etc., un ou deux tubes germinatifs se forment puis se développent en hyphes. Ces derniers se développent en étendant et en ramifiant les extrémités, en libérant des exoenzymes qui décomposent les polymères comme la chitine et la cellulose pour fournir des nutriments.

En réponse à des facteurs de stress tels que l'épuisement des nutriments dans leur environnement, une partie du mycélium végétatif ou du substrat meurt par dégradation autolytique par le biais de la mort cellulaire programmée (MCP) (Ait Barka et al., 2016; Dyson, 2011; Manteca et al., 2006). Cela conduit à la libération de nutriments dans l'environnement qui seront utilisés pour la formation d'hyphes aériens et de spores. Au cours de cette phase, les *Streptomyces* produisent certains produits naturels (PNs) très polyvalents qui ne sont pas nécessaires à la croissance et / ou à la reproduction, mais qui contribuent à protéger leur hôte contre les agents pathogènes concurrents attirés par les nutriments libérés pendant la MCP(Quinn et al., 2020).



**Figure 8.** Cycle de vie de *Streptomyces* sur milieu solide (van der Meij et al., 2017).

## Revue bibliographique

### 3.8.1.4 Production de métabolites secondaires par le genre *Streptomyces*

#### 3.8.1.4.1 Définition et généralités

Le métabolisme secondaire peut se définir comme l'ensemble des voies permettant la synthèse de petites molécules, non essentielles mais qui peuvent fournir un avantage sélectif dans certaines conditions. Ces substances sont connues sous le nom de métabolites secondaires. Le métabolisme secondaire est généralement opposé au métabolisme primaire, qui comprend l'ensemble des voies cataboliques et anaboliques nécessaires à la survie et à la reproduction des cellules. Ainsi, il est difficile de proposer une définition bien adaptée distinguant le métabolisme primaire du métabolisme secondaire, car cette distinction n'existe que dans des conditions de laboratoire bien définies (Haas and Sylvie, 2015). Il existe un large éventail de métabolites secondaires qui peuvent avoir des structures chimiques diverses et complexes ainsi qu'un large éventail d'activités biologiques (Haas and Sylvie, 2015). Nous présentons ici une brève description des applications importantes des métabolites secondaires produits par les *Actinomycètes* (**Figure 6**).

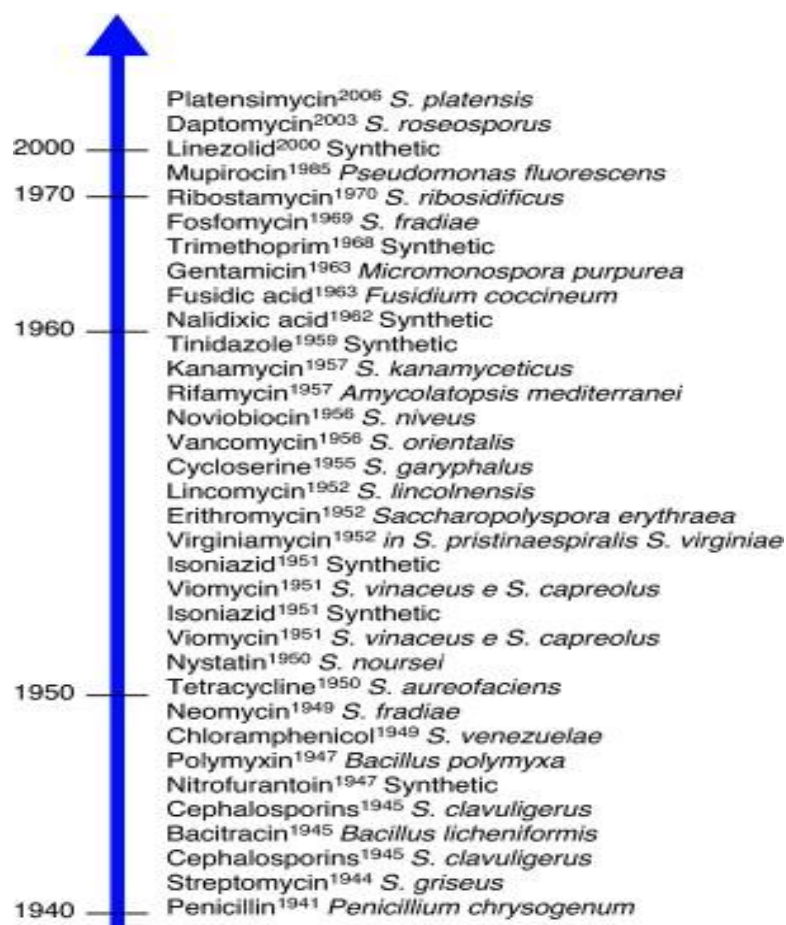
#### 3.8.1.4.2 Production d'antibiotiques

Malgré le succès de la découverte des antibiotiques et les avancements dans le processus de leur production, les maladies infectieuses restent toujours la deuxième cause de décès dans le monde, et les infections bactériennes sont responsables d'environ 17 millions de décès par an, qui touchent principalement les enfants et les personnes âgées (de Lima Procópio et al., 2012). La découverte des antibiotiques a permis de diminuer ou de supprimer la mortalité liée à ces pathologies. (Rudi et al., 2012). La majorité des antibiotiques (80 %) utilisés aujourd'hui sont issus du genre *Streptomyces* (Chater, 2016), les *Actinomycètes* étant les plus importants, cela peut être vu sur la **Figure 9** (Watve et al., 2001). Les analyses génomiques ont révélé que chaque souche de *Streptomyces* possède le matériel génétique nécessaire à la synthèse de multiples métabolites secondaires (Charlop-Powers et al., 2015).

L'histoire des antibiotiques issus de *Streptomyces* a commencé avec la découverte de la Streptothricine en 1942, et avec la découverte de la Streptomycine deux ans plus tard (**Figure 9**), les chercheurs ont approfondi la recherche d'antibiotiques au sein du genre. Les *Actinomycètes* possèdent un rôle important dans la production de divers médicaments qui sont indispensables à la santé et à la nutrition (Hopwood, 2007). Les principales classes d'antibiotiques cliniques produites par les *Actinomycètes* sont les suivantes : Aminoglycosides (Néomycine, Kanamycine, streptomycine (Busscher et al., 2005; Vakulenko and Mobashery, 2003), Angucyclines (Auricine ; également, agents antitumoraux comme la Landomycine et

## Revue bibliographique

la Moromycine (Kharel et al., 2012), Ansamycines (Rifamycine, Geldanamycine) (Kang et al., 2012), Anthracyclines (principalement agents anti-tumoraux, par exemple, Daunorubicine) (Minotti et al., 2004; Nitiss, 2009), les  $\beta$ -lactames (Céphamycines) (Liras, 1999) et aussi l'important inhibiteur de  $\beta$ -lactamase qu'est l'Acide Clavulanique (Jensen and Paradkar, 1999; Saudagar et al., 2008), le Chloramphénicol (Vining and Stuttard, 1995), les Glutarimides (Cycloheximide) (Kominek, 1975), les Glycopeptides (Vancomycine, Teichoplanine) (Butler et al., 2014; Van Bambeke, 2006), Lipopeptides (Daptomycine) (Baltz, 2010), Lantibiotiques (Mersacidine, Actagardine) (Willey and Van Der Donk, 2007), Macrolides (Clarythromycine, Erythromycine, Tylosine, Clarithromycine) (Gaynor and Mankin, 2003; Poehlsgaard and Douthwaite, 2003), oxazolidinones (cyclosérine) (MG, 1955), Streptogramines (Streptogramines) (Johnston et al., 2002) et Tétracyclines (Okami and Hotta, 1988). Egalement la capacité de production des antibiotiques par les *Actinomycètes* peut varier énormément. Certaines espèces de *Streptomyces* produisent un seul antibiotique, tandis que d'autres produisent une gamme de composés et de classes de composés différents.



**Figure 9.** Principaux résultats et dates de la découverte des antibiotiques (de Lima Procópio et al., 2012).

## Revue bibliographique

Les antibiotiques produits par les *Actinomycètes* antagonistes diffèrent par leur nature chimique, leur activité antimicrobienne, leur toxicité pour les animaux et leur potentiel chimio-thérapeutique (Hopwood, 2007). Certains antibiotiques isolés d'*Actinomycètes* sont des préparations brutes, par opposition à d'autres qui ont été cristallisées, et des informations significatives sur leur nature chimique ont été obtenues, notamment le lysozyme, l'Actinomycine, la Micromonosporine, la Streptothricine, la Streptomycine, et la Mycétine (Hopwood, 2007). Certaines *Actinomycètes* produisent plus d'une substance antibactérienne (par exemple, *Streptomyces griseus*), et le même antibiotique peut être produit par différentes *Actinomycètes* (par exemple, Actinomycine, Streptothricine). Le **Tableau 1** représente la liste des antibiotiques produits par les différentes *Actinomycètes* avec une excellente application antimicrobienne.

## Revue bibliographique

**Tableau 1.** Liste d'antibiotiques produits par différentes *Actinomycètes* avec une excellente application antimicrobienne (Hopwood, 2007).

<b>Composé antibiotique</b>	<b>Applications</b>	<b><i>Actinomycètes</i></b>
<b>1,8-Dihydroxy-2-ethyl-3-methylanthraquinone</b>	Anti-tumorale	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>1-Hydroxy-1-norresistomycin</b>	Antibactérien, anticancéreux	<i>Schisandra chinensis</i>
<b>2-Allyloxyphenol</b>	Antimicrobiens, conservateur alimentaire, désinfectant oral	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>Anthracyclines</b>	Anti-tumorale	<i>Streptomyces galileus</i>
<b>Arenicolides A–C</b>	Cytotoxicité légère	<i>Salinispora arenicola</i>
<b>Arenimycin</b>	Antibactériens, anticancéreux	<i>Streptomyces arenicola</i>
<b>Avermectin</b>	Antiparasitaire	<i>Streptomyces avermitilis</i>
<b>Bafilomycin</b>	Inhibiteur d'ATPase de microorganismes, de cellules végétales et animales	<i>Streptomyces griseus</i> , <i>Streptomyces halstedii</i>
<b>Bisanthraquinone</b>	Antibactérien	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>Butenolides</b>	Anti-tumorale	<i>Streptoverticillium luteo verticillatum</i>
<b>Carboxamycin</b>	Antibactérien, anticancéreux	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>Chinikomycins</b>	Anticancéreux	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>Chloramphenicol</b>	Antibactérien, inhibiteur de la protéine biosynthèse des protéines	<i>Streptomyces venezuelae</i>
<b>Cyanospraside A</b>	Inconnu	<i>Solieria pacifica</i>
<b>Daryamides</b>	Antifongique, anticancéreux	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>Frigocyclinone</b>	Antibactérien	<i>Streptomyces griseus</i>
<b>Glaciapyrroles</b>	Antibactérien	<i>Streptomyces</i> sp.
<b>Hygromycin</b>	Antimicrobien, immunosuppresseur	<i>Streptomyces hygrosopicus</i>
<b>Lajollamycin</b>	Antibactérien	<i>Streptomyces Nodosus</i>
<b>Lincomycin</b>	Antibactérien, inhibiteur de la biosynthèse des protéines.	<i>Streptomyces lincolnensis</i>
<b>Marinomycins A–D</b>	Antimicrobien, anticancéreux	<i>Marinispora</i>
<b>Mechercharmycins</b>	Anticancéreux	<i>Thermoactinomyces</i> sp.
<b>Mitomycin C</b>	Anti-tumorale, se lie à l'ADN double brin	<i>Streptomyces lavendulae</i>
<b>Chloramphenicol</b>	Antibactérien, inhibiteur de la protéine biosynthèse des protéines	<i>Streptomyces venezuelae</i>
<b>Pacificanones A et B</b>	Antibactérien	<i>Streptomyces pacifica</i>

sp :Species (espèce).



## Revue bibliographique

### 3.8.1.4.3 Production d'enzymes

Les *Actinomycètes* marines et terrestres produisent une large gamme d'enzymes biologiquement actives. Elles sécrètent des amylases à l'extérieur des cellules, ce qui leur permet d'effectuer une digestion extracellulaire. En raison de sa capacité à dégrader l'amidon, cette enzyme est très importante dans les applications biotechnologiques telles que l'industrie alimentaire, la fermentation et les industries du textile et du papier (Pandey et al., 2000).

Les *Actinomycètes* produisent également des cellulases, qui sont un groupe d'enzymes hydrolytiques qui hydrolysent les liaisons glucosidiques de la cellulose et des dérivés cello-ligosaccharides apparentés. Les *Actinomycètes*, en particulier les *Streptomyces*, sont reconnues pour sécréter de multiples protéases dans le milieu de culture (Sharmin et al., 2005). De même, il a été démontré que les *Actinomycètes* sont une excellente source de L-asparaginase, qui est produite par une variété d'*Actinomycètes*, principalement celles isolées du sol, telles que *Streptomyces griseus*, *Streptomyces karnatakensis*, *Streptomyces albidoflavus*, et *Nocardia* sp. (DeJong, 1972; Narayana et al., 2008). De même, les *Actinomycètes* isolées de l'intestin de poulet et de chèvre ont montré la présence de diverses enzymes telles que l'amylase, la protéase, la phytase et la lipase (Latha and Dhanasekaran, 2013).

### 3.8.1.4.4 Production de pigments

Étant donné que les pigments synthétiques présentent certaines limites, telles que l'utilisation de produits chimiques dangereux pour leur production, les problèmes de sécurité des travailleurs et la production de déchets dangereux. En revanche les pigments d'origine microbienne présentent un intérêt considérable (Hopwood, 2007). Les *Actinomycètes* sont spécifiquement caractérisées par la production de divers pigments sur des milieux naturels ou synthétiques et sont considérées comme une caractéristique culturelle importante dans la description des organismes. Ces pigments se présentent généralement sous différentes nuances de bleu, de violet, de rouge, de rose, de jaune, de vert, de brun et de noir (Hopwood, 2007). Les pigments produits par *Streptomyces* peuvent être soit des endopigments (liés à certaines structures cellulaires), soit des exopigments (excrétés dans le milieu environnant). Parfois, différents antibiotiques produits par les *Actinomycètes* sont considérés comme des pigments. La formation des pigments est influencée par le pH du milieu, l'aération, la température de croissance et les sources de carbone et d'azote; par conséquent, la connaissance de la nature chimique exacte de ces pigments est limitée (Hopwood, 2007). Les *Actinomycètes* ont également la capacité de synthétiser et d'excréter des pigments foncés,

## Revue bibliographique

la mélanine ou mélanoïde, qui sont considérés comme une caractéristique très importante pour les études taxonomiques (Hopwood, 2007).

### 3.8.1.4.5 Probiotiques

Les probiotiques sont des adjuvants microbiens vivants qui ont un effet bénéfique sur l'hôte par divers moyens, tels que la modification de la communauté microbienne associée à l'hôte, en assurant une meilleure utilisation des aliments ou en améliorant leur valeur nutritionnelle, en améliorant la réponse de l'hôte face aux maladies, ou en améliorant la qualité de son environnement ambiant (Hopwood, 2007). Dans une étude préliminaire, Latha and Dhanase, (2013) ont rapporté l'utilisation de *Streptomyces* sp. comme probiotique sur la croissance de la crevette tigrée noire.

Latha et al., (2016) ont analysé 18 souches d'*Actinomycetes* isolés de poulet pour leurs propriétés probiotiques, et les résultats ont révélé que *Streptomyces* sp. JD9 était le plus puissant des isolats avec des propriétés probiotiques distinctes.

### 3.8.1.4.6 Production des bioherbicides

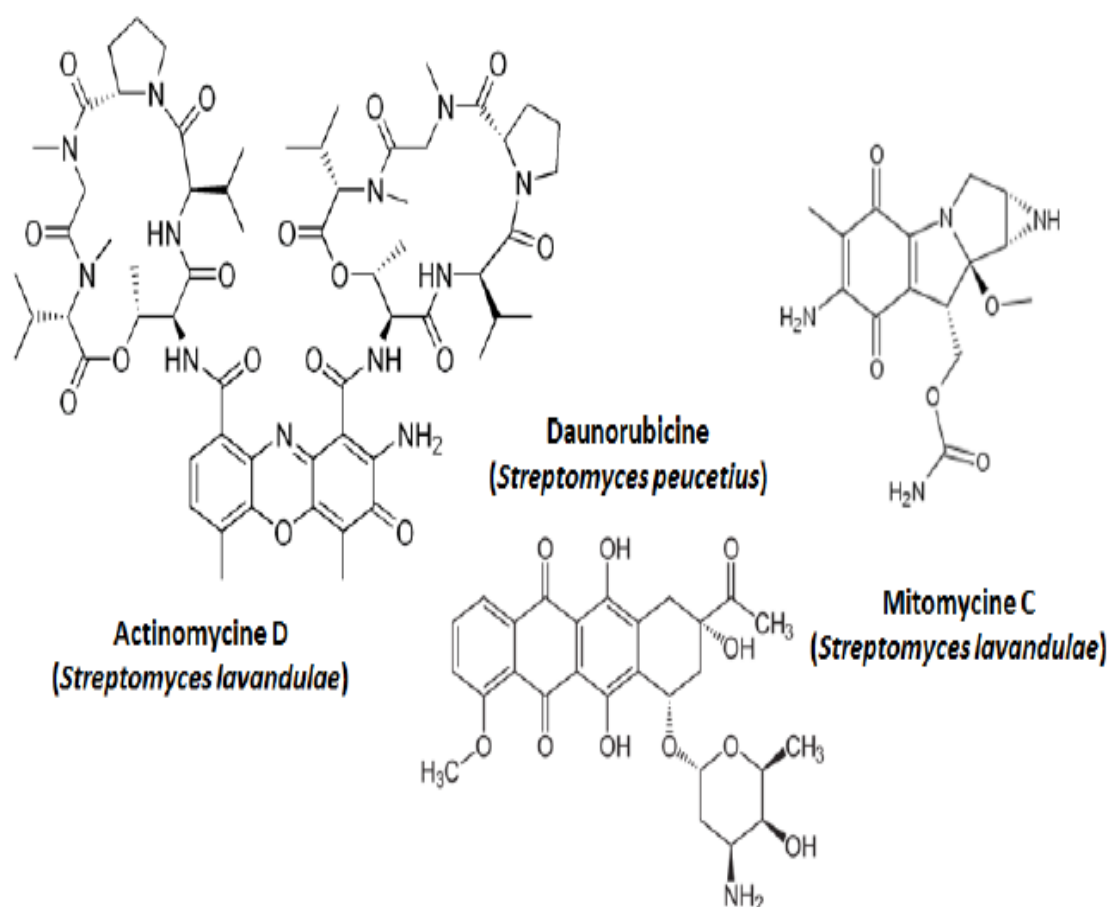
Une autre application très intéressante des *Actinomycètes* est l'utilisation de leurs métabolites secondaires comme herbicides contre les herbes et les mauvaises herbes indésirables. *Streptomyces saganonensis* produisent des herbicidines et des herbimycines qui contrôlent les mauvaises herbes (monocotylédones et dicotylédones) (Hopwood, 2007). L'anisomycine, qui est produite par *Streptomyces* sp., est un type d'inhibiteur de croissance pour les mauvaises herbes à feuilles larges ; l'anisomycine peut détruire la capacité des plantes à synthétiser la chlorophylle. En plus de cela, les herbicides tels que la phtoxazoline, l'hydantocidine, et l'homoalanosine produits par *Streptomyces* sp. peuvent contrôler plusieurs mauvaises herbes (Yan Chu, 1993). L'activité herbicide des composés bioactifs tel que N-phénylpropanamide et N (naphtalène-1-yl) propanamide de *Streptomyces* sp. KA1-3 a également été évaluée par Priyadharsini et al. (2013).

### 3.8.1.4.7 Production d'agents anti-tumoraux

Le cancer est un problème de santé publique majeur dans le monde entier et représente le deuxième taux de mortalité le plus élevé pour tous les groupes d'âge. Il s'agit d'une maladie grave qui a causé la mort de plus de 600 000 personnes l'année dernière aux États-Unis seulement (Siegel et al., 2022). Selon l'organisation mondiale de la santé (OMS), le cancer le plus fréquemment diagnostiqué dans le monde est le cancer du sein avec plus de 2,20 millions de cas enregistrés en 2020 (OMS, 2020) (<https://www.who.int/fr/news-room/fact->

## Revue bibliographique

sheets/detail/breast-cancer). Les espèces de *Streptomyces* sont connues pour héberger divers métabolites secondaires qui sont rapidement utilisés pour la thérapie du cancer (Kumar et al., 2021). Il a été prouvé que certaines molécules du métabolisme secondaire sont capables d'inhiber la multiplication des cellules cancéreuses (Haas and Sylvie, 2015). On peut mentionner l'actinomycine D et la mitomycine C (extraites de *Streptomyces lavandulae*), les anthracyclines (daunorubicine, doxorubicine) qui sont extraites de *Streptomyces peucetius* (Figure 10).



**Figure 10.** Quelques structures de métabolites secondaires naturels produits par le genre *Streptomyces* ayant des propriétés anticancéreuses (Haas and Sylvie, 2015).

# **Matériel & Méthodes**

# Chapitre I

## **Isolement et screening des isolats d'*Actinomycètes* pour leur activité antimicrobienne**

## Matériel et Méthodes

### 1 Isolement des *Actinomycètes*

#### 1.1 Lieux d'échantillonnage et collecte d'échantillons de sol

Les échantillons de sol ont été collectés durant le mois de février et le début du mois de mars 2019 à partir des écosystèmes telluriques variés du Nord-Ouest du Maroc: écosystème froid (trois sites différents dans la région de Fès-Meknès, (Sebt Jahjouh El Hajeb (33°41'16"N, 5°22'15" W), forêt d'Ain Vittel Ifrane (31°42'07"N, 6°20'57"W), et forêt d'Azrou (33° 26' 28" N 5° 13' 22" W)) (**Figure 11**) et un écosystème naturel normal (jardin Titt Mellil appartenant à la région Casablanca-Settat (33°33'14.1"N, 7°29'05.4"W)) (**Figures 12,12a et 12b**).

Pour éviter la répétition de l'isolement des *Actinomycètes* identiques, cinq points d'échantillonnage ont été repérés pour chaque habitat terrestre et dans une zone de 400 m<sup>2</sup> (Sengupta et al., 2015). Les cinq centimètres de la couche supérieure du sol ont été enlevés à l'aide d'une spatule stérile, et 150 à 200 g de la couche sous-jacente ont été prélevés, mélangés et homogénéisés pour générer un sol hétérogène. Les échantillons du sol collectés ont été transportés au laboratoire dans des sachets d'échantillonnage stériles et conservés à 4°C jusqu'à l'utilisation.



**Figure 11.** Lieu d'échantillonnage des souches d'*Actinomycètes* appartenant à la région Fès-Meknès. La carte des sites d'échantillonnage a été récupérée sur Google Maps (Google Maps. Map Data ©2022. Récupéré de [https : https://www.google.com/maps/@32.9937363,-](https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z)

## Matériel et Méthodes



**Figure 12.** Lieu d'échantillonnage des souches *f<sub>0</sub>Cevkpqo {e<sup>3</sup>vgu* appartenant à la région Casablanca-Settat (JardinTitt Mellil). La carte du site d'échantillonnage a été récupérée sur Google Maps (Google Maps.

Map Data ©2022. Récupéré de <https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z>.

<https://www.google.com/maps/@32.9937363,-7.6005892,15z>.



**Figure 12a.** Vue générale du Jardin Titt Mellil.



**Figure 12b.** Sol de l'échantillon Jardin Titt Mellil.

## Matériel et Méthodes

### 1.2 Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

Le pH de chaque échantillon de sol a été déterminé à l'aide d'un pH-mètre (OCRISON, micro-pH 2000) préalablement étalonné à différents pH (4, 7 et 10) en plongeant l'électrode dans une suspension dont le rapport (Sol/Eau distillée) est de 2/5 (g/mL) respectivement. La conductivité électrique (CE) a été déterminée via un conductimètre (sevenGo™); la texture par la technique de sédimentation; l'azote total par la méthode de Dumas; la matière organique (MO) par la technique du spectrophotomètre UV-visible (Jackson, 1973); et les minéraux tels que C, O, Mg, Si, Fe, K et Ca ont été analysés par microscope électronique à balayage (MEB) (JEOL : JSM-IT500HR)(Stefaniak et al., 2006) tandis que les autres minéraux Zn, Mn, Cl, Al, P, Cu et S ont été analysés par la méthode de fluorescence X à dispersion d'énergie (Epsilon 3XLE de PANalytical, France)(Thirion-Merle, 2016).

### 1.3 Prétraitement des échantillons de sol

Afin d'augmenter le nombre des *Actinomycètes*, les échantillons de sol ont été prétraités selon deux méthodes : soit par séchage à température ambiante durant une période de 7 jours (Sengupta et al., 2015), soit par la méthode d'enrichissement qui consiste à prélever dix grammes (10 g) de chaque échantillon préalablement séché, tamisé et mélangé à un gramme (1g) de carbonate de calcium ( $\text{Ca CO}_3$ ) puis incubé à température ambiante pendant (7-9) jours (Kitouni et al., 2005).

### 1.4 Isolement, purification et conservation des souches d'*Actinomycètes*

L'isolement a été effectué par la méthode de dilution en série (Valan Arasu et al., 2009). Brièvement, 10 g de chaque échantillon de sol ont été broyés, tamisés puis mélangés avec 90 mL d'eau distillée stérile. La suspension obtenue a été agitée par homogénéisateur à la vitesse maximale pendant 30 minutes. Ensuite, après la décantation, les surnageants ont été dilués en série jusqu'à  $10^{-4}$ , et 100  $\mu\text{L}$  de chaque dilution a été étalée sur quatre milieux d'isolement des *Actinomycètes* : (1) M2 (Bouaziz et al., 2016), (2) GA (Bouaziz et al., 2016), (3) GLM (Das et al., 2018a; Thakur et al., 2007) et (4) Bennett (Lee et al., 2011) (**Annexe**). Chaque milieu a été mélangé après stérilisation et refroidissement à 50 mg / L d'actidone (cycloheximide) pour inhiber la croissance fongique. Les boîtes de Pétri ont ensuite été incubées à 28°C et vérifiées quotidiennement durant une période d'une à trois semaines.

Les colonies d'*Actinomycètes* reconnues par leurs aspects macroscopiques et microscopiques aux *Actinomycètes* ont été repiquées sur milieu ISP2 (**Annexe**) par la méthode des stries afin d'obtenir des cultures pures. La technique consiste à prélever à l'aide d'une pipette pasteur



## Matériel et Méthodes

stérile un inoculum à partir des colonies d'un milieu d'isolement, qui sera par la suite ensemencé sur les mêmes milieux que ceux utilisés pour l'isolement. Enfin, les colonies pures obtenues ont été conservées à court terme à 4°C sur gélose inclinée ISP2, et à -20°C en suspension en présence de 20 % de glycérol pour un stockage à long terme (Marimuthu et al., 2020).

### 2 Les microorganismes-tests

L'effet antimicrobien des isolats d'*Actinomycètes* a été testé *vis-à-vis* des bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853), à Gram positif (*Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* ATCC 14579), la levure *Candida albicans* ATCC 60193 (collection Institut Pasteur Casablanca Maroc), des champignons phytopathogènes (*Fusarium* sp. MN944566, *Fusarium* sp. MN944567, *Fusarium* sp. MN944568, *Fusarium* sp. MN944569, *Fusarium* sp. MN944570, *Fusarium* sp. MN944571, *Fusarium* sp. MN944572, *Fusarium* sp. MN944573, *Fusarium* sp. MN944574, *Fusarium* sp. MN944575, *Fusarium* sp. MN944576, *Fusarium* sp. MN944577) (Identification au Laboratoire Agroalimentaire et Santé, identification moléculaire au CNRST Rabat), 2 autres champignons, *Trichoderma longibrachiatum* M37 et *Trichoderma koningii* M35 qui provoquent des infections pulmonaires invasives et des infections péritonéales respectivement (procurées auprès de la Collection du CCMM, CNRST Rabat, Maroc), et 6 souches cliniques multirésistantes (*Escherichia coli* 16D1150, *Enterococcus faecalis* 18K1386, *Staphylococcus aureus* 18K1052, *Proteus vulgaris* 16C1737, *Klebsiella pneumoniae* 18k1514 et *Neisseria gonorrhoeae* 16D1170) (Collection du Laboratoire d'analyse médicale Pasteur Settat Maroc). Ces souches multirésistantes ont été isolées à partir de 6 patients (4 prélèvements des urines (ECBU), 1 prélèvement urétral et 1 prélèvement de pus (**Tableau 3**).

## Matériel et Méthodes

**Tableau 2.** Origine des microorganismes-tests.

Nom de microorganismes-tests	Clinique ou non	Type de prélèvement	Origine de prélèvement
<i>Staphylococcus aureus</i> 18k1052	Clinique	Pus	Pasteur Settat
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 18k1514	Clinique	ECBU	Pasteur Settat
<i>Enterococcus faecalis</i> 18k1386	Clinique	ECBU	Pasteur Settat
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> 16 D1170	Clinique	PU	Pasteur Settat
<i>Proteus vulgaris</i> 16 C1737	Clinique	ECBU	Pasteur Settat
<i>Escherichia coli</i> 16D1150	Clinique	ECBU	Pasteur Settat
<i>Escherichia Coli</i> ATCC 25922	Non clinique	-	Institut Pasteur Casablanca
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	Non clinique	-	Institut Pasteur Casablanca
<i>Pseudomonas aerogiosa</i> ATCC 27853	Non clinique	-	Institut Pasteur Casablanca
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Non clinique	-	Institut Pasteur Casablanca
<i>Candida albicans</i> ATCC 60193	Non clinique	-	Institut Pasteur Casablanca
<i>Trichoderma koningii</i> (M35)	Non clinique	-	Laboratoire Agroalimentaire et Santé, UH1
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> (M37)	Non clinique	-	Laboratoire Agroalimentaire et Santé, UH1
<i>Fusarium sp.</i> MN944566-MN944577	Non clinique	-	Laboratoire Agroalimentaire et Santé, UH1
<i>Fusarium sp.</i> MN944566-MN944577	Non clinique	-	Laboratoire Agroalimentaire et Santé, UH1

Pus : Prélèvement de pus, Pu : Prélèvement urétrale, ECBU : Examen cyto bactériologique des urines, UH1 : Université Hassan 1<sup>er</sup>.

### 2.1 Ré-identification des bactéries-tests multirésistantes.

Avant d'entamer l'activité antibactérienne *vis-à-vis* des bactéries-tests collectées, nous avons procédé à la vérification des résultats d'identification de ces bactéries apportées par le laboratoire d'analyse médicale Pasteur Settat.

## **Matériel et Méthodes**

### **2.1.1 Repiquage des bactéries-tests**

Le repiquage se fait par la culture de bactéries dans des milieux appropriés. En utilisant un milieu ordinaire CLED pour le repiquage des entérobactéries, un milieu sélectif (chapman) pour les cocci à Gram positif et un milieu Muller-Hinton additionné au sang pour les *Gonocoques*. L'incubation s'effectue à 37°C pendant 24 heures.

### **2.1.2 Coloration de Gram**

La coloration de Gram est basée sur la différence de la perméabilité de la paroi des bactéries à l'alcool, donc sur leur capacité à retenir dans leur cytoplasme un colorant primaire. Cette différence de perméabilité est liée à une différence de structure pariétale des deux grandes groupes Gram+ et Gram-. Après l'incubation, les colonies qui ont apparue sont soumises à une coloration de Gram en respectant la chronologie suivante :

- Coloration par un colorant primaire (cristal de violet ou violet de Gentiane).
- Précipitation du colorant primaire par lugol.
- Décoloration (élution) par l'alcool, ou le mélange alcool acétone.
- Recoloration par un colorant secondaire (Fuchsine de ziehl diluée au 1/10).

Les bactéries Gram + apparaissent en bleu foncé ou violet, les Gram - en rose ou rouge.

### **2.1.3 Identification classique pour les Entérobactéries**

Les souches qui appartiennent à la famille des Entérobactéries (*E. coli* 16D1150, *Proteus vulgaris*) ont été identifiées par la galerie classique afin de vérifier leurs caractères biochimiques. Cette galerie permet de tester la réaction à : l'uréase, indole, fermentation du mannitol et la mobilité, fermentation de citrate, fermentation de thiol de sulfate (H<sub>2</sub>S), fermentation de lactose, fermentation de glucose et production de gaz.

#### **2.1.3.1 Préparation des milieux de la galerie classique**

Quatre milieux ont été utilisés pour identifier les caractères biochimiques des entérobactéries. Ces milieux comprennent : Urée-Indole (Prêt à l'emploi), Citrate de Simmons, Kligler-Hajna et Mannitol-Mobilité (la composition de chaque milieu est figurée dans l'**Annexe**). Après stérilisation à l'autoclave, les milieux ont été coulés dans des tubes à essai en verres stériles en respectant le coulage spécifique pour chaque milieu.

#### **2.1.3.2 Ensemencement des milieux et incubation**

Les milieux liquides (Urée-Indole ou eau peptonée) sont ensemencés avec une öse ou goutte de produit. Les milieux semi-solides (Mannitol-Mobilité) sont inoculés par une piqure

## **Matériel et Méthodes**

centrale profonde. Les milieux solides inclinés (Citrate de Simmons) sont ensemencés par stries serrés en partant du bas de la tranche ou bien en stries longitudinales droite. Les milieux solides en culot, sont ensemencés à la fois par piqure dans le culot et en stries sur la pente (Kligler-Hajna). Puis les tubes sont incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

### **2.1.3.3 Lecture de la galerie classique**

#### **2.1.3.3.1 Mise en évidence de l'Uréase**

L'uréase est une enzyme qui hydrolyse l'urée et conduit à la formation d'ammoniac et dioxyde de carbone. En solution, le produit final de la réaction est le carbonate d'ammonium qui alcalinise le milieu. Une uréase positive conduit à une coloration rouge violacée ou orange foncée du milieu.

#### **2.1.3.3.2 Mise en évidence de la production d'indole**

Après l'incubation à 24 heures, une goutte (50 µL) de réactif de Kovacs est ajoutée dans le milieu Urée-Indole. Une réaction indole-positive conduit à l'apparition d'un anneau rouge en surface du tube.

#### **2.1.3.3.3 Fermentation de citrate**

La fermentation de citrate conduit à l'apparition d'une coloration bleue qui correspond au virage du milieu. C'est-à-dire la bactérie utilise ce substrat comme seul source de carbone.

#### **2.1.3.3.4 Fermentation de thiol de sulfate (H<sub>2</sub>S)**

La fermentation de H<sub>2</sub>S conduit à l'apparition d'une coloration noire au fond du tube Kligler-Hajna.

#### **2.1.3.3.5 Fermentation de lactose et glucose**

La fermentation du lactose et glucose correspond respectivement à l'apparition d'une pente virant au jaune et culot jaune sur milieu Kligler-Hajna.

#### **2.1.3.3.6 Production de gaz**

La production de gaz correspond à l'apparition de bulles dans la masse de milieu Kligler-Hajna.

#### **2.1.3.3.7 Fermentation du mannitol**

La dégradation du mannitol entraîne le virage du milieu mannitol-mobilité au jaune.

## **Matériel et Méthodes**

### **2.1.3.3.8 Détermination de la mobilité**

Les bacilles mobiles diffusent à partir de la ligne d'ensemencement en produisant un trouble du milieu. Mais les bacilles immobiles poussent uniquement le long de la piqûre d'ensemencement.

### **2.1.4 Antibiogramme en milieu gélosé-Méthode des disques**

Le but est de vérifier la multi-résistance des bactéries aux antibiotiques qui sont utilisés en routine. La méthode utilisée est celle recommandée par CA-SFM/ EUCAST (Dubreuil et al., 2020), méthode par diffusion des disques imprégnés d'antibiotiques, qui consiste à déposer à la surface d'une gélose Mueller-Hinton, ensemencée par la souche bactérienne à étudier, des disques de papier filtre imprégnés des antibiotiques à tester. Les antibiotiques diffusent dans la gélose à partir des disques sources.

## **2.2 Préparation de l'inoculum**

A partir d'une culture jeune de 18-24 heures, l'inoculum a été préparé dans l'eau physiologique à l'aide d'un spectrophotomètre fixé à une longueur d'onde de 625 nm de manière à obtenir une absorbance entre 0,08 à 0,13 qui correspondent entre  $10^6$  et  $10^7$  bactéries/mL (Reghioua et al., 2006; Dubreuil et al., 2020).

## **2.3 Ensemencement par écouvillonnage**

La technique consiste à plonger un écouvillon en coton stérile dans la suspension bactérienne, puis l'excès de liquide est éliminé en tournant l'écouvillon sur les parois du tube, puis on fait l'ensemencement en stries sur toute la surface de la gélose en prenant soins de ne pas laisser d'espace entre les stries (Dubreuil et al., 2020).

## **2.4 Déposition des disques**

Après l'ensemencement des boîtes de Pétri par écouvillonnage, les disques d'antibiotiques ont été déposés par une pince stérile (6 disques au maximum sur une boîte de 90 mm), ensuite les boîtes ont été placées à l'étuve à 37°C pendant 24 heures (Dubreuil et al., 2020).

## **2.5 Lecture**

La lecture s'effectue par la mesure des diamètres des zones d'inhibition à l'aide d'une règle. En utilisant des abaques fournies par le fabricant des disques, ces diamètres sont traduits en catégories S (sensibles), I (Intermédiaires) ou R (Résistants) (Dubreuil et al., 2020).

## Matériel et Méthodes

### 3 Mise en évidence de l'activité antimicrobienne en milieu solide

#### 3.1 Criblage primaire des isolats d'*Actinomycètes*

Afin de sélectionner le meilleur milieu pour la production d'antibiotiques, l'activité antimicrobienne des isolats purs a été testée par la méthode de double couche (Badji et al., 2005) sur quatre milieux solides (ISP1, ISP2, GYEA et Bennett) (**Annexe**) pour les différents microorganismes (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus ceureus* ATCC 14579 et *Candida albicans* ATCC 60193), 12 champignons phytopathogènes (*Fusarium* sp. MN944566, *Fusarium* sp. MN944567, *Fusarium* sp. MN944568, *Fusarium* sp. MN944569, *Fusarium* sp. MN944570, *Fusarium* sp. MN944571, *Fusarium* sp. MN944572, *Fusarium* sp. MN944573, *Fusarium* sp. MN944574, *Fusarium* sp. MN944575, *Fusarium* sp. MN944576, *Fusarium* sp. MN944577, et 2 autres champignons, *Trichoderma longibrachiatum* M37 et *Trichoderma koningii* M35, qui provoquent des infections pulmonaires invasives et des infections péritonéales respectivement. Dans la méthode de double couche, des souches pures d'*Actinomycètes* ont été ensemencées par touches d'environ 15-20 mm au centre de chaque milieu, puis incubées à 28°C pendant 10 jours. Les cultures ont été recouvertes par 5 mL de Muller Hinton (MH) faiblement gélosé (8 g d'agar / L) et préalablement inoculé avec un microorganisme cible. Après la solidification de la deuxième couche, les boîtes de Pétri ont été ré-incubées à 37°C pendant 24 heures pour les bactéries et 48 heures pour les champignons. L'activité antimicrobienne a été examinée en mesurant les zones d'inhibition en mm (mm).

### 4 Production de molécules antimicrobiennes sur milieu liquide

#### 4.1 Cinétique de production des métabolites secondaires

Afin de déterminer le jour optimal de production des métabolites secondaires, les cinétiques ont été suivies pendant 10 jours sur un milieu bouillon ISP2 sélectionné lors du criblage primaire. Brièvement, une öse remplie de culture mature d'*Actinomycètes* (10 jours) est inoculée dans une fiole Erlenmeyer (250 mL) contenant 50 mL de milieu bouillon ISP2. Après deux jours d'agitation (28°C, 150 rpm), 5 mL de chaque pré-culture ont été prélevés pour inoculer des Erlenmeyer (250 mL) contenant chacun 50 mL du milieu, qui seront placés sous agitation continue pendant dix jours.

L'évolution de l'activité antibactérienne a été déterminée quotidiennement durant ces 10 jours en utilisant la méthode de diffusion sur gélose Muller Hinton (méthode de puits) (50 µL du surnageant de culture par puits de 6 mm de diamètre) (Aouiche et al., 2012; Badji et al., 2006)

## Matériel et Méthodes

contre *Bacillus cereus* ATCC 14579. L'évolution du pH a été mesurée au cours de ce temps selon la méthode décrite par Pfefferle et al., (2000).

### 4.2 Fermentation et extraction des métabolites secondaires

Les isolats d'*Actinomycètes* qui ont montré une activité antimicrobienne importante lors du criblage primaire (milieu solide) ont été cultivés en milieu de culture liquide (ISP2), ensuite après fermentation, une extraction liquide-liquide en ampoule à décanter a été réalisée avec quatre solvants organiques de polarité croissante (hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et n-butanol). En effet, des fioles Erlenmeyer de 500 mL contenant 100 mL de bouillon de culture ISP2 choisi lors du criblage primaire ont été inoculées avec chaque isolat d'*Actinomycètes* actif et incubées sous agitation permanente à 150 rpm à 28°C. La durée d'agitation correspond au jour optimal de production des métabolites, c'est-à-dire le jour où l'on observe une bonne activité antimicrobienne (cette durée a été déterminée lors de la cinétique de production). Afin de sélectionner le meilleur solvant d'extraction, les cultures ont été centrifugées à 10 000 g pendant 20 minutes pour éliminer la masse mycélienne. Un volume de surnageant a été récupéré et mélangé vigoureusement dans une ampoule à décanter avec le même volume d'hexane. La phase aqueuse obtenue est ensuite mélangée avec le même volume de dichlorométhane et ainsi de suite avec les autres solvants organiques (acétate d'éthyle et butanol). Les extraits organiques obtenus ont été ensuite évaporés sous vide dans un évaporateur rotatif (Buchi B-491 Heating Bath) sans dépasser 45°C pour ne pas dénaturer les métabolites recherchés. Enfin, les résidus secs obtenus ainsi que ceux des phases aqueuses résiduelles ont été solubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) pour calculer leurs concentrations (Juvonen, 1998; Valan Arasu et al., 2009).

## 5 Évaluation de l'activité antimicrobienne des extraits organiques

L'activité antimicrobienne des extraits de la phase organique obtenue a été évaluée par la méthode de diffusion de disques précédemment rapportée par Badji et al., (2005) contre 4 champignons phytopathogènes (*Fusarium* sp. MN944568, *Fusarium* sp. MN944569, *Fusarium* sp. MN944570, *Fusarium* sp. MN944571 et *Fusarium* sp. MN9445677), et contre un autre champignon, *Trichoderma longibrachiatum* M37 qui induit une infection pulmonaire invasive; enfin l'activité antimicrobienne a été testée *vis-à-vis* de 5 souches cliniques multirésistantes (*Escherichia coli* 16D1150, *Enterococcus faecalis* 18K1386, *Staphylococcus aureus* 18K1052, *Proteus vulgaris* 16C1737 et *Neisseria gonorrhoeae* 16D1170). Ces souches ont été obtenues auprès du laboratoire d'analyse médicale Pasteur Settat. Le profil de

## **Matériel et Méthodes**

résistance des bactéries-cibles aux antibiotiques a été vérifié contre 16 antibiotiques (**Tableau 4**).



## Matériel et Méthodes

**Tableau 3.** Profil de résistance des bactéries cliniques multirésistantes (BMR).

Souches-tests BMR	Résistance aux	Sensible aux	Intermédiaire aux	Familles
<i>Escherichia coli</i> 16D1150	P, AMP, AML, AMC, <b>CXM</b> , <b>CTX</b> , <b>FD</b> , <b>SXT</b> , <b>CIP</b> , <b>OFX</b> , <b>VA</b>	CRO	CN, F	<b>Pénicillines</b> , <b>Céphalosporines</b> , <b>Steroidiques</b> , <b>Sulfamides</b> <b>Quinolones</b> et <b>Glycopeptides</b>
<i>Proteus vulgaris</i> 16C1737	P, AMP, AML, AMC, <b>CXM</b> , <b>CTX</b> , <b>SXT</b> , <b>FD</b> , <b>F</b>	CN, CRO, OFX,	CIP, AK	<b>Pénicillines</b> , <b>Céphalosporines</b> , <b>Sulfamides</b> , <b>Steroidiques</b> ,
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> 16D1170	P, AMP, AML, <b>NA</b> , <b>FMQ</b> , <b>OFX</b> , <b>TE</b> , <b>SXT</b> , <b>FD</b> ,	AMC, CRO, AN, CN, CRO, E, F	CIP,	<b>Pénicillines</b> , <b>Quinolones</b> Tetracyclines, <b>Sulfamides</b> <b>Steroidiques</b>
<i>Staphylococcus aureus</i> 18K1052	P, AMP, AMX, AMC, <b>CRO</b> , <b>CIP</b> , <b>NA</b> , <b>FMQ</b> , <b>OFX</b> .	KF, CXM, AN, GN, E, SXT, FD, IPM, F	-	<b>Pénicillines</b> , <b>Céphalosporines</b> <b>Quinolones</b>
<i>Enterococcus faecalis</i> 18K1386	P, AMP, <b>KF</b> , <b>CXM</b> , <b>CRO</b> , <b>AN</b> , <b>GN</b> , <b>CIP</b> , <b>NA</b> , <b>FMQ</b> , <b>OFX</b> , E, <b>FD</b>	AMX, AMC, SXT, F	IPM	<b>Pénicillines</b> , <b>Céphalosporines</b> , <b>Aminosides</b> , <b>Quinolones</b> Erythromycine <b>Steroidiques</b>

AML: Amoxicilline ; AMC: Amoxicilline + Ac.clavulanique; P: Pénicilline G; AMP: Ampicilline; KF: Cefalotine; CRO: Ceftriaxone; AN: Amikacine; CN: Gentamicine; CIP: Ciprofloxacine; NA: Acide nalidixique; FMQ: Flumequine; OFX: Ofloxacine; E: Erythromycine; TE: Tétracycline; SXT: Triméthoprim+Sulfamide; FD: Acide Fusidique; F: Nitrofurantoïne; CXM: Céfuroxine; VA: Vancomycine; CTX: Céfotaxime ; IPM: Imipénème.

## Résultats et Discussions

En ce qui concerne l'activité antifongique, les champignons sont repiqués sur un milieu de culture PDA et incubés à 28°C pendant 10 jours. Les densités optiques de chaque inoculum ont été ajustées par un spectrophotomètre (Selectra VR2000, Barcelone, Espagne) réglé à une longueur d'onde à 623 nm pour obtenir une densité optique comprise entre 0,18 et 0,20, qui correspond à environ  $10^6$  spores / mL (Bastide et al., 1986). Brièvement, 20 µL d'extrait ont été déposés dans chaque disque stérile de 6 mm de diamètre.

Les disques imbibés sont laissés sécher quelques minutes au près du bec bunsen puis déposés à l'aide d'une pince stérile à la surface du milieu Muller-Hinton Agar (MHA) préalablement étalé avec les microorganismes-tests par la technique d'écouvillonnages. Concernant les souches fongiques, elles ont étéensemencées sur la gélose d'extrait de pomme de terre (PDA). Un disque chargé de DMSO d'un volume égal à celui de l'extrait a été utilisé comme contrôle négatif. Pour le contrôle positif, les antibiotiques suivants : la streptomycine et le cycloheximide ont été utilisés pour les activités antibactériennes et antifongiques, respectivement. Les boîtes de Pétri sont mises à 4°C pendant 2 heures pour permettre une diffusion des molécules. Ensuite, les diamètres des zones d'inhibitions ont été mesurés en mm après 24 heures d'incubation à 37°C pour les bactéries et 48 heures à 28°C pour les champignons.

## **Chapitre II**

# **Caractérisation taxonomique des isolats d'*Actinomycètes* sélectionnées**

## Résultats et Discussions

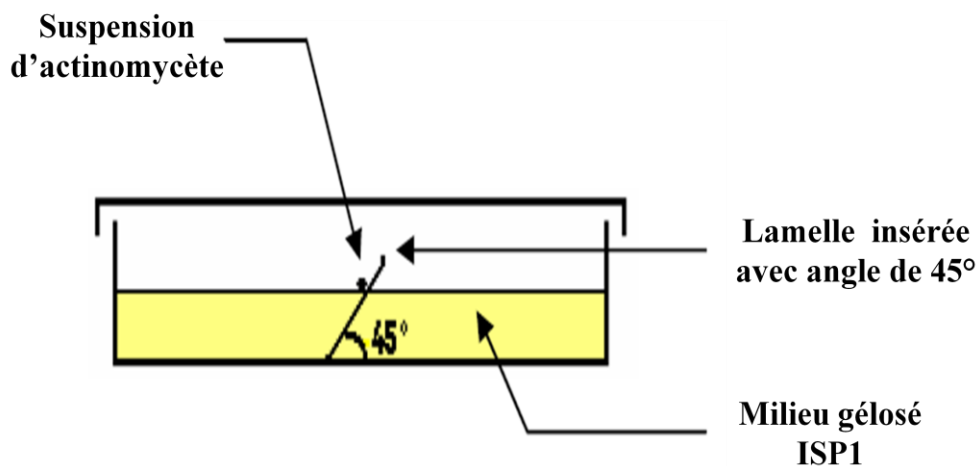
### 1 Etude morphologique, biochimique et physiologique des isolats

#### 1.1 Caractérisation morphologique

Les caractéristiques culturelles telles que l'importance de la croissance, la pigmentation du milieu, l'aspect des colonies et la présence de pigments diffusibles dans la gélose ont été observées sur les milieux ISP (International *Streptomyces* Project) (ISP-1, ISP-2, ISP-4, ISP-5 et GYEA) selon une étude antérieure (SHIRLING, 1966). Tous ces milieux ont été ensemencés par la technique des stries pour chaque isolat, puis les boîtes de Pétri ont été incubées à 28°C et vérifiées quotidiennement pendant 10 jours.

#### 1.2 Caractères micro-morphologiques

Les caractères micro-morphologiques des isolats purs ont été déterminés au microscope optique avec une caméra numérique (Olympus CX43RF) à l'état frais et après coloration de Gram par la technique de culture sur lamelle (Williams and Cross, 1971). La technique consiste à insérer délicatement une lamelle stérile dans le milieu ISP1 solide de manière à former un angle de 45 ° avec celui-ci (**Figure 13**). Une goutte de suspension bactérienne est déposée contre la lamelle en contact avec la surface du milieu, après 10 jours d'incubation à 28°C, la lamelle est retirée délicatement de la gélose et déposée sur une lame puis observée au microscope optique à différents grossissement (Williams and Cross, 1971).



**Figure 13.** Schéma présentant la technique de culture sur lamelle (Manar Ibrahim et al., 2020).

#### 1.3 Caractérisation biochimique et physiologique

Les caractères physiologiques et biochimiques des isolats d'*Actinomycètes* ont été évalués selon les études précédentes (Juvonen, 1998; Singh et al., 2016). Elles concernent la production de pigments mélanoides, la tolérance à différentes concentrations croissantes en

## Résultats et Discussions

chlorure de sodium NaCl (1, 2, 3, 4, 5, 7 et 10 %), la tolérance à différentes valeurs de pH (4,63; 5,33 ; 6,41; 7,31; 8,28 ; 9,27 et 10,03), la croissance à différents degrés de température (4, 28, 37 et 46°C) et l'assimilation des glucides et ses dérivés comme seul source de carbone. Sur la base de l'étude des caractéristiques culturelles, biochimiques et physiologiques, une classification hiérarchique des groupes d'*Actinomycètes* a été réalisée à l'aide d'un logiciel spécifique (IBM SPSS statistics 23). Après l'analyse, un dendrogramme a été généré en calculant la distance moyenne entre les groupes.

### 2 Identification moléculaire des isolats d'*Actinomycètes*

#### 2.1 Extraction de l'ADN génomique

Les *Actinomycètes* ont été inoculés dans un volume de 50 mL du milieu ISP2 sans Agar et sous agitation permanente pendant 5 à 7 jours jusqu'à ce que la turbidité du milieu soit élevée. Les cellules ont été concentrées par centrifugation à 10 000 g pendant 20 minutes à 4°C à l'aide d'une centrifugeuse (SIGMA 3K30), puis congelées sans surnageants dans des tubes à eppendorfs de 2 mL à -20°C jusqu'à l'utilisation (Hei et al., 2021). L'extraction de l'ADN génomique des isolats d'*Actinomycètes* a été réalisée par un kit automatisé de la plateforme « Mag Purix Bacterial DNA Extraction Kit » en suivant les instructions du fabricant. L'ADN extrait de chaque isolat a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 8000 (thermo scientific) en calculant les rapports 260/280 et 260/230. L'ADN extrait a été stocké à -20°C jusqu'à l'utilisation.

#### 2.2 Amplification par PCR conventionnelle

Toutes les concentrations des échantillons d'ADN extraits, ont été ajustées à 100 ng /  $\mu$ L pour la réaction de PCR. La réaction d'amplification a été préparée pour les 12 échantillons d'ADN selon le protocole suivant en utilisant les amorces FD1 et RP2 (**Tableau 2**).

**Tableau 4.** Mélange réactionnel pour 1 tube.

Réactifs (2x MyTaq DNA polymerase kit de Bioline)	Quantité pour 1 tube
2x buffer	10 $\mu$ L
FD1 10 $\mu$ M	2 $\mu$ L
RP2 100 $\mu$ M	2 $\mu$ L
ADN	100 ng
H <sub>2</sub> O (qualité moléculaire)	QSP (quantité suffisante pour Vt =25 $\mu$ L)

Vt : Volume total.

## Résultats et Discussions

L'amplification du gène codant pour l'ARNr 16S des souches d'*Actinomycètes* a été effectuée dans un thermocycleur « **Verity** » d'ABI en utilisant les amorces bactériennes universelles Fd1 (5'-AGAGTTTGATCATGGCTCAG-3') et rP2 (5'-ACGGTTACCTTGTTACGACTT-3') décrites par Weisburg et al., (1991) pour obtenir un amplicon d'une taille de 1500 bp dans les conditions réactionnelles suivantes : Dénaturation initiale à 95°C pendant 2 min suivie de 35 cycles à 95°C pendant 30 sec , 52°C pendant 30 sec et 72°C pendant 30 sec et une extension finale à 72°C pendant 3 min (Weisburg et al., 1991).

### 2.3 Analyse des produits PCR par électrophorèse sur gel d'agarose

Les produits amplifiés ont été analysés par électrophorèse. Plus précisément, 8 µL de produits PCR ont été déposés sur gel d'agarose (1 %) en présence du marqueur de poids moléculaire 1 kb (thermo scientific). La photo a été visualisée par le système photo G-Box de Gel-Documentation.

### 2.4 Séquençage et construction de l'arbre phylogénétique

Les produits amplifiés obtenus ont été purifiés en utilisant le kit de purification PCR ExoSAP-IT (AppliedBiosystems) et les réactions de séquençage ont été effectuées en utilisant un kit de séquençage Big Dyeterminator cycle sequencing kit version 3.1 (AppliedBiosystems). Les conditions de thermocyclage optimales de la réaction de séquençage du cycle étaient les suivantes : 25 cycles à 96°C pendant 1 min, 96°C pendant 10 s, 50°C pendant 5 s, et 60°C pendant 4 min. Le produit d'amplification a été conservé par la suite à 4°C. Les produits de séquençage ont été purifiés en utilisant le kit de purification Big Dye ® X Terminator™ (Applied Biosystems), puis chargés sur un séquenceur capillaire ABI 3130xL (Applied Biosystems) conformément aux instructions du fabricant. L'assemblage des séquences obtenues a été réalisé à l'aide du logiciel DNA Baser Assembler version 5.15.0 afin de générer les contigs, qui ont été enregistrés sous forme FASTA (.FASTA). Les séquences nucléotidiques ont été alignées avec le logiciel MEGA-X version 10.2.5 (Kumar et al., 2018) en utilisant l'alignement par MUSCLE. Pour désigner le statut taxonomique des isolats d'*Actinomycètes*, les séquences assemblées et alignées ont été comparées à la base de données de séquences d'ARN de référence non redondantes (refseq\_rna) archivée dans la Banque de données génomiques, accessible sur Internet sur le site du Centre national pour les informations biotechnologiques (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) en utilisant le programme de recherche de nucléotides BLAST. L'arbre phylogénétique a été construit avec

## **Résultats et Discussions**

le même logiciel d'alignement en utilisant la méthode du « Neighbour-joiningtree » qui est la plus couramment utilisée en microbiologie(Saitou and Nei, 1987).

## **Chapitre III**

# **Mise en évidence de l'activité antioxydante et anticancéreuse des souches d'*Actinomycètes* sélectionnées**



## Résultats et Discussions

### 1 Propriétés antioxydantes

#### 1.1 Dosage des poly-phénols totaux (Analyse quantitative)

Le dosage des composés phénoliques totaux présents dans les extraits organiques d'*Actinomycètes* a été réalisé par la méthode de Folin-Ciocalteu (Bensadón et al., 2010). 3 mL de réactif de Folin Ciocalteu dilué (1 :10) a été ajouté à 500 µL d'échantillon ou de standard (1mg/mL préparé dans le méthanol) avec des dilutions convenables. Ensuite, 3mL de la solution de carbonate de sodium (6 %) ont été ajoutés au mélange réactionnel. Après 1 h d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière, l'absorbance a été mesurée à 760 nm. La concentration des composés phénoliques a été calculée à partir de l'équation de régression de la gamme d'étalonnage établie avec l'acide gallique :

$$y = 0,663x + 0,003 ; R^2 = 0,936$$

#### 1.2 Dosage de la teneur en flavonoïdes (analyse quantitative)

La quantification de la teneur en flavonoïdes dans les extraits organiques d'*Actinomycètes* a été réalisée par la méthode du trichlorure d'aluminium (Bahorun et al., 1996). 1 mL d'échantillon ou standard (préparé dans le méthanol) a été ajouté à 1 mL de la solution d'AlCl<sub>3</sub> (2 % dans le méthanol). Après 10 minutes, l'absorbance a été lue à 415 nm. La concentration des flavonoïdes a été déduite à partir de la gamme d'étalonnage établie avec la quercétine :

$$y = 4,812x + 0,044 ; R^2 = 0,997$$

#### 1.3 Activités antioxydantes *in vitro*

##### 1.3.1 Méthode de piégeage des radicaux libres (DPPH)

L'activité de piégeage des radicaux libres (DPPH) des extraits organiques d'*Actinomycètes* a été réalisée selon la méthode de (Blois, 1965). Dans une microplaque de 96 puits, 40 µL des solutions d'extraits bruts à 1mg / mL ont été ajoutés à 160 µL de DPPH (0,1mM dans le Méthanol), Le mélange réactionnel a été agité pendant 10 secondes et puis incubé à l'obscurité pendant 30 minutes à température ambiante. Après l'incubation, l'absorbance a été mesurée à 517 nm en utilisant un lecteur de microplaques Elisa (2100-C, Optic Ivymen Systems, Espagne). L'acide ascorbique a été utilisé comme un antioxydant positif. Le pourcentage de piégeage des radicaux libres DPPH des extraits a été calculé selon l'équation suivante :

## Résultats et Discussions

$$\text{Activité anti – radicalaire DPPH (\%)} = \left[ \frac{(A0 - A1)}{(A0)} \right] \times 100$$

**A0** : Absorbance du blanc

**A1** : Absorbance de l'échantillon.

Toutes les expériences ont été analysées en triplicata pour chaque échantillon.

### 1.3.2 Activité de piégeage des radicaux libres (ABTS)

L'activité de piégeage des radicaux libres (ABTS) des extraits a été réalisée selon la méthode développée par Re et al., (1999). Brièvement, l'ABTS<sup>+</sup> cationique a été généré en mélangeant 7 mM d'ABTS (dissous dans l'eau distillée) avec 2,45 mM de persulfate de potassium (dissous dans l'eau distillée) pendant une nuit dans l'obscurité. L'éthanol a été utilisé pour diluer la solution concentrée d'ABTS<sup>+</sup> jusqu'à une absorbance de 0,7 à 734 nm à l'aide d'un spectrophotomètre (Selectra VR2000, Barcelona, Espagne). 2 mL de la solution ABTS<sup>+</sup> dilués ont été ajoutés à 100 µL de chaque échantillon à 1mg / mL. Les mesures ont été réalisées en triplicata pour chaque échantillon. Le Trolox a été utilisé comme un antioxydant positif. L'activité de piégeage des radicaux libres ABTS<sup>+</sup> des extraits a été calculée en utilisant la formule du test DPPH.

### 1.3.3 Test du pouvoir antioxydant réducteur ferrique (FRAP)

L'activité réductrice du fer des extraits a été déterminée selon la méthode décrite par Oyaizu, 1986. Ensuite, 500 µL de chaque extrait (1 mg / mL) ont été mélangés avec 1,25 mL de tampon phosphate (0,2 M, pH 6,6) et 1,25 mL d'une solution aqueuse à 1 % d'hexacyanoferrate de potassium K<sub>3</sub> [Fe (CN)<sub>6</sub>] dans un tube à essai. La solution résultante a été incubée dans un bain-marie à 50°C pendant 20 minutes, puis 1,25 mL d'acide trichloracétique (10 %) ont été ajoutés pour stopper la réaction, et les tubes ont été centrifugés à 3000 tours/minute pendant 10 minutes. Une aliquote de 1,25 mL de surnageant a été combinée avec 1,25 mL d'eau distillée et 0,5 mL d'une solution aqueuse de FeCl<sub>3</sub> à 0,1 %. L'absorbance a été mesurée à 700 nm par rapport à un blanc préparé de façon similaire, l'extrait était remplacé par de l'eau distillée. L'acide ascorbique a été utilisé comme standard positif.

## 2 Mise en évidence de l'activité anticancéreuse

### 2.1 Culture cellulaire et cytotoxicité

La lignée cellulaire de cancer du sein humain triple négative MDA-MB-468 est maintenue dans le milieu de culture RPMI 1640 enrichi avec du sérum de veau fœtal 5 %, préalablement

## Résultats et Discussions

décomplémenté à 56°C pendant 30 minutes et supplémenté avec 1 % de la Pénicilline-Streptomycine et 0,2 % de L-glutamine. Les cellules sont maintenues dans des incubateurs à 37°C sous atmosphère de 5 % de CO<sub>2</sub>. L'effet cytotoxique des extraits sur les cellules cancéreuses est évalué par le test au cristal violet (Feoktistova et al., 2016). Brièvement, environ 10<sup>4</sup> cellules par puits sont incubées dans une microplaque de 96 puits avec 100 µL du milieu de culture complet; la microplaque est ensuite placée dans un incubateur (37°C, 5 % CO<sub>2</sub>) pendant au moins 6 heures. Ensuite, les cellules sont stimulées par des concentrations croissantes de chaque extrait allant de 0,78 à 100 µg / mL puis incubées dans les mêmes conditions pendant 24 heures. À la fin de l'incubation, le milieu de culture de chaque puits est remplacé par 70 µL de cristal violet (5 %). Après 30 min, l'excès du cristal violet est éliminé suivi d'un lavage sous le robinet avec un débit faible. A la fin, 100 µL de l'SDS 1 % est ajouté dans chaque puits et la densité optique est mesurée à l'aide d'un lecteur de plaques à 540 nm. Trois essais expérimentaux ont été effectués en utilisant le DMSO comme contrôle négatif et le paclitaxel comme contrôle positif.

Le pourcentage de lyse est calculé selon la formule suivante :

$$\% \text{ de lyse} = 100 \times \left( 1 - \frac{DO}{DO_0} \right)$$

**DO<sub>0</sub>** : Densités optiques du contrôle négatif

**DO** : Densités optiques des échantillons (cellules traitées par l'extrait).

### 2.2 Evaluation de l'activité hémolytique par le test d'hémolyse

L'activité hémolytique des extraits organiques bruts des *Actinomycètes* a été déterminée par le test d'hémolyse en utilisant des globules rouge (RBC) humains comme décrit par Rajendran et al., (2017) et Zhu et al., (2002) avec quelques modifications. Les érythrocytes (RBC) humains d'individus sains ont été collectés dans des tubes à bouchon violet contenant de l'EDTA (Anticoagulant). 2 mL de sang total ont été ajoutés à 4 mL d'une solution saline tamponnée au phosphate (PBS), puis le mélange a été centrifugé à 9000 g pendant 5 min à 24°C. Le surnageant obtenu a été éliminé et le culot est lavé deux fois avec 10 mL de PBS et finalement dilué à 20 mL avec du PBS. 400 µL de la suspension des RBC diluée ont été ajoutés à 1,6 mL de chaque extrait préparé dans PBS à des concentrations 0,125 ; 0,625 ; 1,25 et 3,12 mg / mL (groupe test), PBS (groupe négatif), Dodécylsulfate de sodium (groupe positif). L'expérience a été réalisée en double. Les tubes ont été maintenus dans un incubateur

## Résultats et Discussions

à 37°C pendant 1h puis centrifugés pendant 5 min à 5000 g et la densité optique (DO) a été mesurée à 540 nm. Le degré hémolytique a été exprimé par le taux d'hémolyse selon la formule suivante :

$$\text{Taux d' hémolyse} = \left[ \frac{(DO (\text{Test}) - DO (\text{Contrôle négatif}))}{DO(\text{Contrôle positif}) - DO (\text{Contrôle négatif})} \right] \times 100 \%$$

### 3 Analyse UV-visible des extraits organiques

Les spectres d'absorption des extraits actifs solubilisés dans le DMSO ont été enregistrés entre 190 et 850 nm à l'aide d'un spectrophotomètre UV-vis à balayage (HACH lange DR6000) (Chakraborty et al., 2022).

## Chapitre IV

# **Identification des molécules à activités biologiques (antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses), de l'extrait dichloromécanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646**

## Résultats et Discussions

### 1 Analyse CPG-SM des extraits organiques

Le profil des composés volatils des extraits bruts bioactifs a été caractérisé par chromatographie en phase gazeuse (CPG) (Agilent 7890A Series) couplée à la spectrométrie de masse (SM) équipée d'un injecteur multimode et d'une colonne HP-5MS avec une dimension de 30 m × 0,250 mm × 0,25 µm à l'Institut de la Fondation marocaine pour les sciences avancées, l'innovation et la recherche (MAScIR). 4 µL de l'extrait solubilisé dans un volume adéquat de DMSO ont été injectés dans la colonne en mode fractionné 1:4 en utilisant de l'hélium comme gaz porteur à 1,7 mL/ min. Les températures de la source d'ions et des quadrupôles étaient respectivement de 230 et 150°C. Le programme de température du four a débuté à 60°C et s'est terminé à 360°C. L'identification des composés a été réalisée en comparant les spectres de masse obtenus avec les données disponibles dans la bibliothèque MS 2017 du NIST(Chakraborty et al., 2022; Pizzino et al., 2017).

### 2 Analyse statistique

Les données de toutes les expériences ont été répétées au moins deux fois et les résultats ont été exprimés en Moyenne ± écart type. L'analyse Ordinary one-way ANOVA suivie par test de comparaisons multiples de Tukey a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad software Inc., San Diego,CA,USA) pour vérifier les différences significatives entre les groupes dans les tests des activités antioxydantes, anticancéreuse, test d'hémolyse et le dosage des composés phénoliques. Les résultats ont été considérés comme statistiquement significatifs lorsque  $p \leq 0,05$ . Une analyse de coefficient de corrélation par Pearson a été réalisée à l'aide du logiciel GraphPad Prism 8.4.3 (GraphPad software Inc., San Diego, CA, USA) pour déterminer la relation entre le nombre total des *Actinomycètes* et les paramètres physico-chimiques du sol ainsi la relation entre les composés phénoliques et l'activité antioxydante.

# Résultats & Discussions

## **Chapitre I**

# **Isolement et screening des isolats d'*Actinomycètes* pour leur activité antimicrobienne**



## Résultats et Discussions

L'isolement de nouvelles souches d'*Actinomycètes* productrices de nouveaux métabolites secondaires bioactifs, à partir de nouveaux habitats inexplorés pourrait être d'une grande utilité pour lutter contre les bactéries multirésistantes (BMR). En effet, le Maroc présente plusieurs niches écologiques inexplorées et à notre connaissance, il n'y a pas d'informations disponibles concernant les activités biologiques et antimicrobiennes des souches d'*Actinomycètes* isolées dans des environnements froids.

Le travail présenté dans ce premier chapitre a pour objectif de sélectionner les isolats d'*Actinomycètes* productrices de métabolites les plus actifs. Cette étude a été réalisée en trois étapes. La première étape consiste à détecter les paramètres physico-chimique du sol tels que le pH, la conductivité électrique, la matière organique, l'azote total, le carbone organique, la texture du sol et les minéraux afin de déterminer leur corrélation avec le nombre total d'*Actinomycètes* (TNA). La deuxième étape est l'isolement des souches d'*Actinomycètes*. La dernière étape est de réaliser un criblage primaire et secondaire *vis-à-vis* des microorganismes pathogènes et non pathogènes.

### 1 Isolement des souches d'*Actinomycètes*

#### 1.1 Analyses physico-chimiques des échantillons de sol

Les résultats de l'analyse physico-chimique des échantillons de sol dans les quatre habitats sont présentés dans le **Tableau 5** et les **Figures 14A, 14B, 14C et 14D**.

L'analyse du sol du site A, a montré qu'il s'agit d'un sol alcalin ( $\text{pH} = 8,3$ ), non salé ( $\text{CE} = 0,20 \text{ dS / m}$ ). Le diagramme de texture nous a permis de classifier ce sol comme un sol sablo-limoneux, pauvre en argile (19,97 %), avec une quantité normale d'azote total (0,15 %) et modérément riche en matière organique (3,48 %). En outre, l'analyse des minéraux par fluorescence des Rayons X et par microscope électronique à balayage (MEB) a révélé la présence de cations échangeables tels que K, Mg, Al, Ca et Si. Les éléments tels que O, Fe et Si étaient présents en concentrations élevées, suivis par Al, Ca, K et Mg (**Tableau 5, Figure 14A**).

Le sol du site B est un sol alcalin ( $\text{pH}=8,57$ ), sableux (90,01 %), non salé ( $\text{CE}=0,30$ ). Il est relativement pauvre en argile et en limon, et a une teneur normale en azote total. Il s'agit d'un sol riche en matière organique (5,65 %) et pauvre en éléments minéraux à l'exception de O, Ca et Si qui étaient présents en concentrations élevées (**Tableau 5, Figure 14B**).

## Résultats et Discussions

**Tableau 5.** Analyse physico-chimique des échantillons de sol.

<b>Paramètres physico-chimiques</b>	<b>Site A</b>	<b>Site B</b>	<b>Site C</b>	<b>Site D</b>
<b>Types de sols texturés</b>	Sableux-limoneux	Sableux	Sableux-limoneux	Sableux-limoneux
<b>Argile (%)</b>	19,9	5,00	9,99	5,00
<b>Sable (%)</b>	50,0	90,0	55,0	75,0
<b>Limon (%)</b>	29,9	4,99	34,9	19,9
<b>pH</b>	8,30	8,57	7,29	7,71
<b>CE (ds/m)</b>	0,20	0,30	0,15	0,32
<b>MO (%)</b>	3,48	5,65	7,61	2,43
<b>N (%)</b>	0,15	0,24	0,33	0,10
<b>Mg (%)</b>	1,09	0,31	1,59	0,35
<b>Al (%)</b>	5,91	1,08	6,70	3,59
<b>K (%)</b>	1,59	2,79	1,39	1,04
<b>Ca (%)</b>	2,83	23,0	0,74	14,3
<b>S (%)</b>	0,11	0,03	0,01	0,87
<b>Cl (%)</b>	0,15	0,04	-	0,51
<b>P (%)</b>	0,31	0,00	0,36	0,28
<b>Fe (%)</b>	14,8	1,63	12,5	5,44
<b>Mn (%)</b>	0,13	0,04	0,20	0,05
<b>Cu (%)</b>	0,03	-	0,01	0,01
<b>Zn (%)</b>	0,01	0,01	0,03	0,01

“Site A” Sebt Jahjouh El Hajeb; “Site B” Forêt Ain Vittel Ifrane; “Site C” Forêt Azrou; “Site D” Jardin Tit Mellil Casablanca “-” non détectables; “CE” Conductivité électrique; “MO” Matière organique; “N” Azote total.

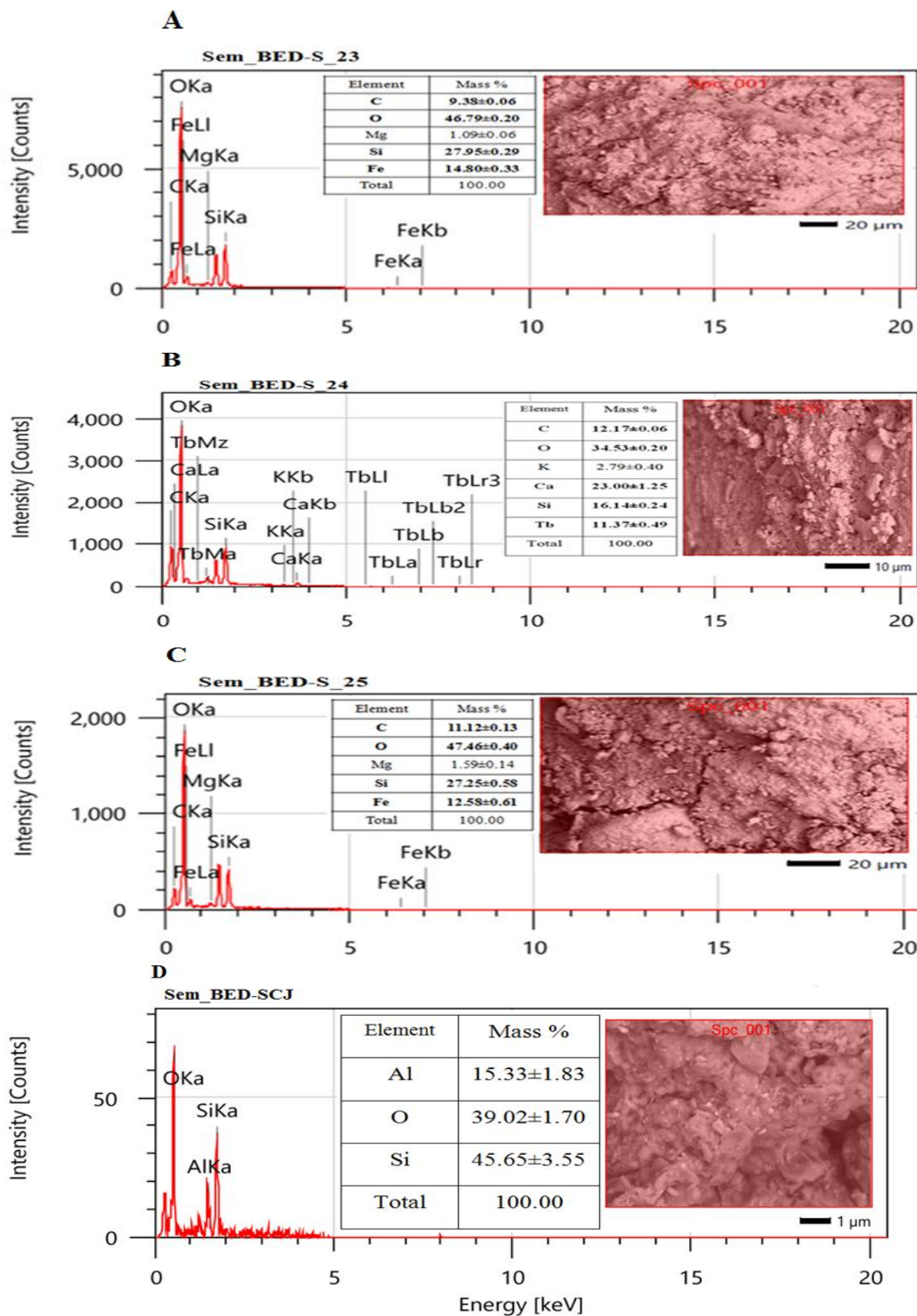


Figure 14. Analyse des minéraux par microscope électronique à balayage (MEB).

## Résultats et Discussions

Le sol du site C, est un sol sablo-limoneux avec un pH légèrement alcalin, non salin et a une teneur en azote total légèrement élevée. Il est riche en matière organique (7,61 %) et modérément riche en éléments minéraux (K, Mg, Si, etc.), bien que O, Si et Fe aient été détectés en concentrations élevées (**Tableau 5, Figure 14C**). Les données relatives aux valeurs de pH du sol dans les trois sites ont montré quelques différences entre les différentes textures de sol. La valeur la plus faible (pH = 7,29) a été enregistrée dans la texture sablo-limoneuse, tandis que la plus élevée (pH = 8,57) a été enregistrée dans la texture sableuse. Les valeurs de carbone organique les plus élevées ont été enregistrées dans les sites à texture sablo-limoneuse (sites B et C), à l'exception du site D (carbone organique non détecté).

Le sol du site D est un sol sablo-limoneux au pH légèrement alcalin, non salé, avec une teneur normale en azote total et en matière organique. Il est pauvre en éléments minéraux, à l'exception de Si, O, Al, Ca et Fe qui étaient présents en grandes quantités (**Tableaux 5, Figure 14D**).

Ces différences ont été précédemment documentées par plusieurs études qui ont rapporté que l'analyse des propriétés physico-chimiques du sol telles que la texture, le pH, la salinité, les éléments minéraux, la teneur en matière organique et l'azote total pouvaient influencer les communautés microbiennes du sol, en particulier les *Streptomyces* sp., qui étaient les microorganismes les plus abondants identifiés dans le sol (EL-Kamali et al., 2017; Tecon and Or, 2017). Silver et al., (2000), ont constaté que la texture du sol joue un rôle essentiel dans le stockage souterrain du carbone organique dans les écosystèmes du sol et a un impact important sur la disponibilité et la rétention des nutriments.

Afin de comprendre l'impact des conditions écologiques sur la distribution des *Streptomyces* dans différents sols, une analyse statistique a été réalisée pour déterminer la corrélation entre chaque paramètre physico-chimique du sol et le nombre total de *Streptomyces*. Une corrélation entre ces paramètres et le nombre total des *Actinomycètes* (NTA) a été trouvée. Il y avait une corrélation positive significative entre le NTA et la matière organique ( $r = 1,00^{**}$ ,  $p < 0,01$ ), et entre le NTA et l'azote total ( $r = 1,00^{**}$ ,  $p < 0,01$ ). En outre, il y avait une corrélation négative significative entre le NTA et le soufre (S) ( $r = -1,00^{**}$ ,  $p < 0,01$ ), et entre le NTA et le Cl ( $r = -1,00^{**}$ ,  $p < 0,01$ ) (**Tableau 6**).

## Résultats et Discussions

**Tableau 6.**Corrélation de Spearman entre les paramètres physico-chimiques du sol et le nombre total des *Actinomycètes* (NTA) dans les quatre sites A, B, C et D.

N°	Variables	Valeur-r (Spearman)	Significativité P-value
1	NTA VS Conductivité électrique	-0,800	Non significative
2	NTAVS pH	-0,200	Non significative
3	NTAVS Carbone organique	0,500	Non significative
4	NTAVS Matière organique	1,000**	P≤0,01
5	NTAVS Azote Total	1,000**	P≤0,01
6	NTAVS Texture argile	0,211	Non significative
7	NTAVS Texture sable	0,500	Non significative
8	NTAVS texture limon	0,400	Non significative
9	NTAVS Magnésium	0,400	Non significative
10	NTAVS Aluminium	0,500	Non significative
11	NTAVS Silicium	-0,500	Non significative
12	NTAVS Potassium	-0,500	Non significative
13	NTAVS Calcium	-0,400	Non significative
14	NTAVS Oxygène	0,400	Non significative
15	NTAVS Soufre	-1,000**	P≤0,01
16	NTAVS Chlore	-1,000**	P≤0,01
17	NTAVS Phosphore	0,400	Non significative
18	NTAVS Fer	-0,500	Non significative
19	NTAVS Manganèse	0,400	Non significative
20	NTAVS Cuivre	-0,500	Non significative
21	NTAVS Zinc	0,800	Moyennement significative

“\*\*\*” La corrélation est significative au niveau de 0,01. "NTA" Nombre total des *Actinomycètes*.  
 “N° ” Numéro de chaque variable.

Une étude similaire a été rapportée par Dhanasekaran et al., (2009). Nos résultats sont cohérents avec ceux de Ghanem et al., (2000), qui ont montré une corrélation positive significative entre l'azote total, la matière organique et le nombre total des *Actinomycètes*, tandis que les corrélations avec le pH, la température et le phosphate dissous ont révélé des valeurs non significatives. On peut conclure que, même si les *Actinomycètes* soient omniprésents, la dynamique de leurs populations est souvent influencée par les nutriments

## Résultats et Discussions

disponibles et les conditions physico-chimiques de l'écosystème. En outre, il a été signalé que le pH du sol exerce une pression sélective sur la croissance bactérienne (Bååth, 1996; Rousk et al., 2009). Contrairement aux champignons, qui préfèrent les milieux acides et humides, la majorité des *Actinomycètes* se développent mieux dans des conditions légèrement alcalines (Lewin et al., 2016). De plus, Lee and Hwang., (2002) ont signalé que la majorité des *Actinomycètes* du sol sont neutrophiles. Ils se développent dans une gamme de pH comprise entre 7 et 11, avec une croissance optimale à un pH neutre ou légèrement alcalin (entre 7 et 8)(Basilio et al., 2003). Ils sont particulièrement sensibles à l'acidité (Davet, 1996a). Par conséquent, le pH moyen de nos échantillons est de 7,97, ce qui signifie que le pH du sol est légèrement alcalin et n'empêche pas la croissance des *Actinomycètes*.

### 1.2 Isolement des souches d'*Actinomycètes*

Un nombre total de 45 souches d'*Actinomycètes* présumées phénotypiquement différentes ont été isolées à partir de quatre types d'échantillons de sol, dont 11 souches (24,44 %) du site A, 14 souches (31,11 %) du site B, 19 souches (42,22 %) du site C et une souche (2,22 %) du site D (**Tableau 7**). Les souches d'*Actinomycètes* ont été récupérées dans les quatre milieux sélectifs utilisés (M2, BEN, GLM et GA).

Le nombre maximum d'isolats a été récupéré à partir du milieu M2 (n=21), suivi par BEN (n=11), GLM (n=9) et GA (n=4) (**Tableau 7 et Figure 15**). D'après ce tableau on peut constater que le nombre total de *Streptomyces* isolés était élevé dans les sites B et C par rapport aux sites A et D, ce qui reflète la richesse de ces deux sites en matière organique (**Tableau 5**). Lee and Hwang, (2002) ont signalé que la teneur en matière organique du sol peut également être un indicateur environnemental important influençant la colonisation des *Actinomycètes*. Une autre étude a rapporté que le nombre d'*Actinomycètes* augmente en tandem avec la teneur en matière organique dans le sol (Zanane et al., 2018). Ces résultats ont été confirmés par la présente étude, dans laquelle une corrélation positive significative a été trouvée entre le NTA et la matière organique (**Tableau 6**).

## Résultats et Discussions

**Tableau 7.** Nombre total des isolats de *Streptomyces* obtenus dans les quatre sites (A, B, C et D) en fonction de leurs milieux de culture.

Site de collecte des échantillons de sol	Nombre de colonies d' <i>Actinomycètes</i> dans différents milieux d'isolement (x10 <sup>3</sup> UFC/mL)				Nombre total de colonies d' <i>Actinomycètes</i> (x10 <sup>3</sup> UFC/mL)	Nombre de colonies présentant des caractéristiques morphologiques distinctes dans chaque milieu				Nombre total d'isolats
	M2	Ben	GLM	GA		M2	Ben	GLM	GA	
Site A	80	9	16	12	117	4	2	4	1	11
Site B	60	26	14	4	104	7	4	2	1	14
Site C	45	12	14	14	85	9	4	3	2	19
Site D	4	0	0	0	6	1	0	0	0	1
<b>Total</b>	189	47	44	30	312	21	11	9	4	45

"Site A" Sebt Jahjouh El Hajeb ; "Site B" Forêt d'Ain Vittel Ifrane ; "Site C" Forêt d'Azrou ; "Site D" Jardin Tit Mellil Casablanca ; "UFC" Unité Formant Clonie.

## Résultats et Discussions

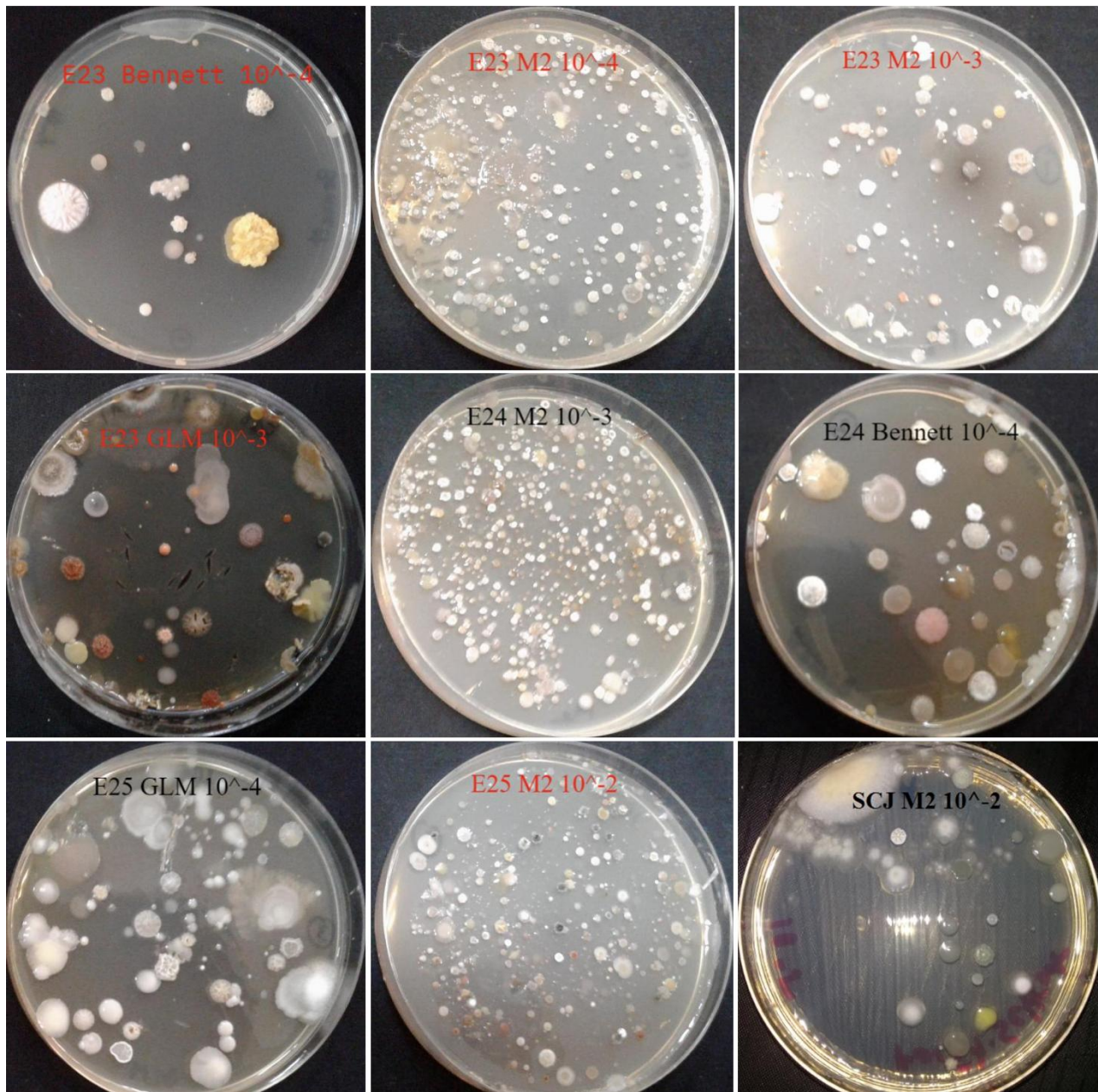
En outre, le prétraitement des échantillons de sol avec du bicarbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) vise à réduire la flore fongique et à augmenter le nombre d'*Actinomycètes* probables (Ullah et al., 2012). Selon une étude précédente (Basilio et al., 2003), le séchage des échantillons de sol pendant 7 à 21 jours à température ambiante peut réduire la flore microbienne du sol car les colonies bactériennes à croissance rapide inhibent la croissance d'autres bactéries, notamment les *Actinomycètes*. Afin d'isoler les *Actinomycètes*, le nombre de ces bactéries (bactéries à croissance rapide autres que les *Actinomycètes*) doit être réduit. Par ailleurs, l'ajout d'un agent antimicrobien aux milieux de culture s'est avéré efficace pour éliminer les micro-organismes contaminants et faciliter ainsi la croissance des *Actinomycètes* à croissance lente (Das et al., 2018b).

L'isolement a été effectué sur quatre milieux de culture choisis en fonction d'études antérieures (Bouaziz et al., 2016; Das et al., 2018b; Lee and Hwang, 2002; Thakur et al., 2007). Comparé aux milieux BEN, GLM et GA, le milieu M2 est apparu comme le meilleur pour isoler les *Actinomycètes*. Ce résultat pourrait être expliqué par la présence de macromolécules (amidon et caséine) dans ce milieu (M2), qui sont catabolisées par la majorité des *Actinomycètes* et rendent le milieu (M2) favorable à leurs croissance (Boughachiche et al., 2012). De plus, ce milieu contient des oligo-éléments indispensables à la croissance bactérienne (Boughachiche et al., 2012).

Le milieu GA était le moins efficace pour isoler les *Actinomycètes*, ce qui suggère que le composant principal de ce milieu (L-asparagine) ne pourrait pas fournir une source d'azote adéquate pour les *Actinomycètes* isolés dans les deux régions (Fès-Meknès et Tit Mellil-Casablanca).

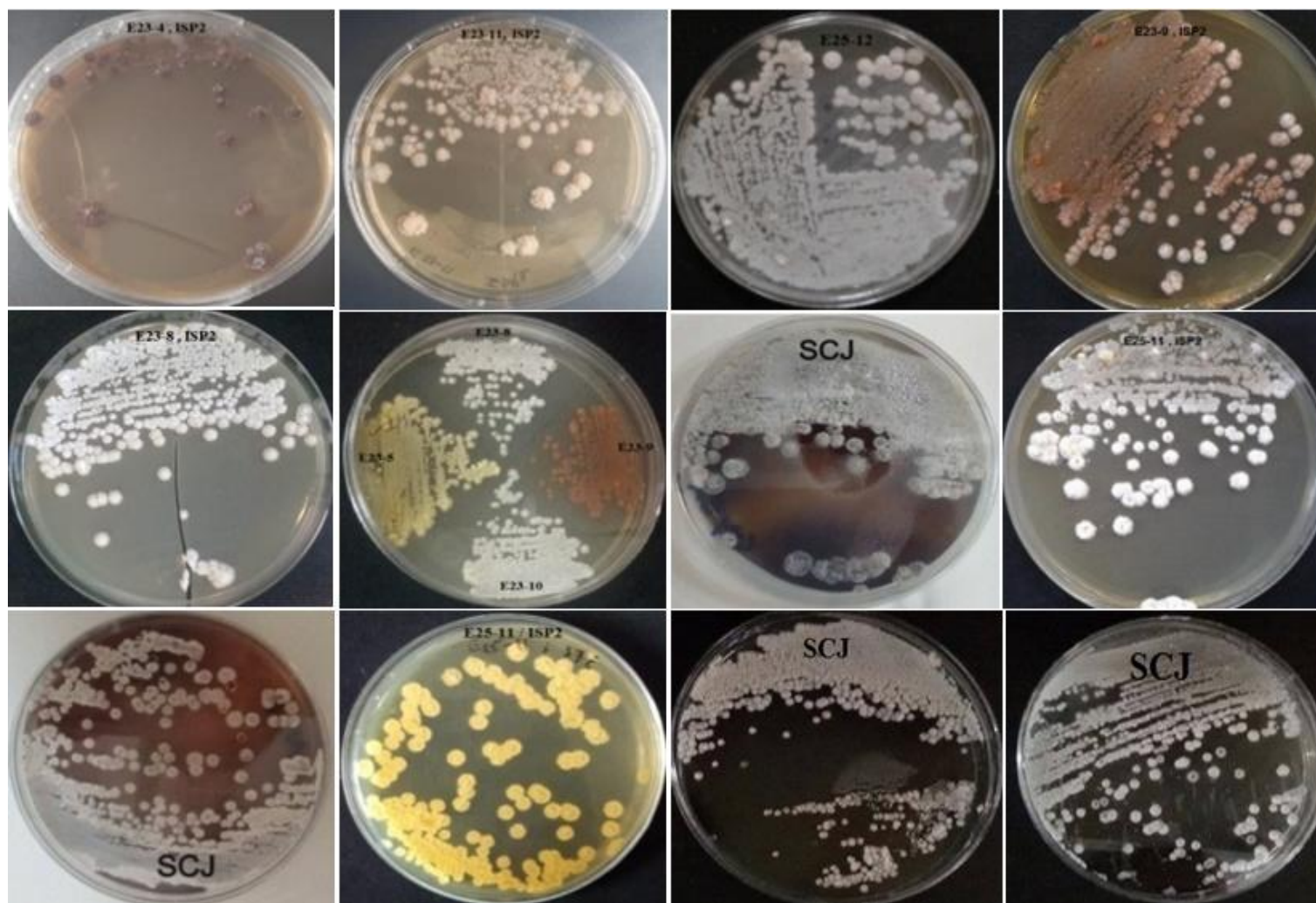


## Résultats et Discussions



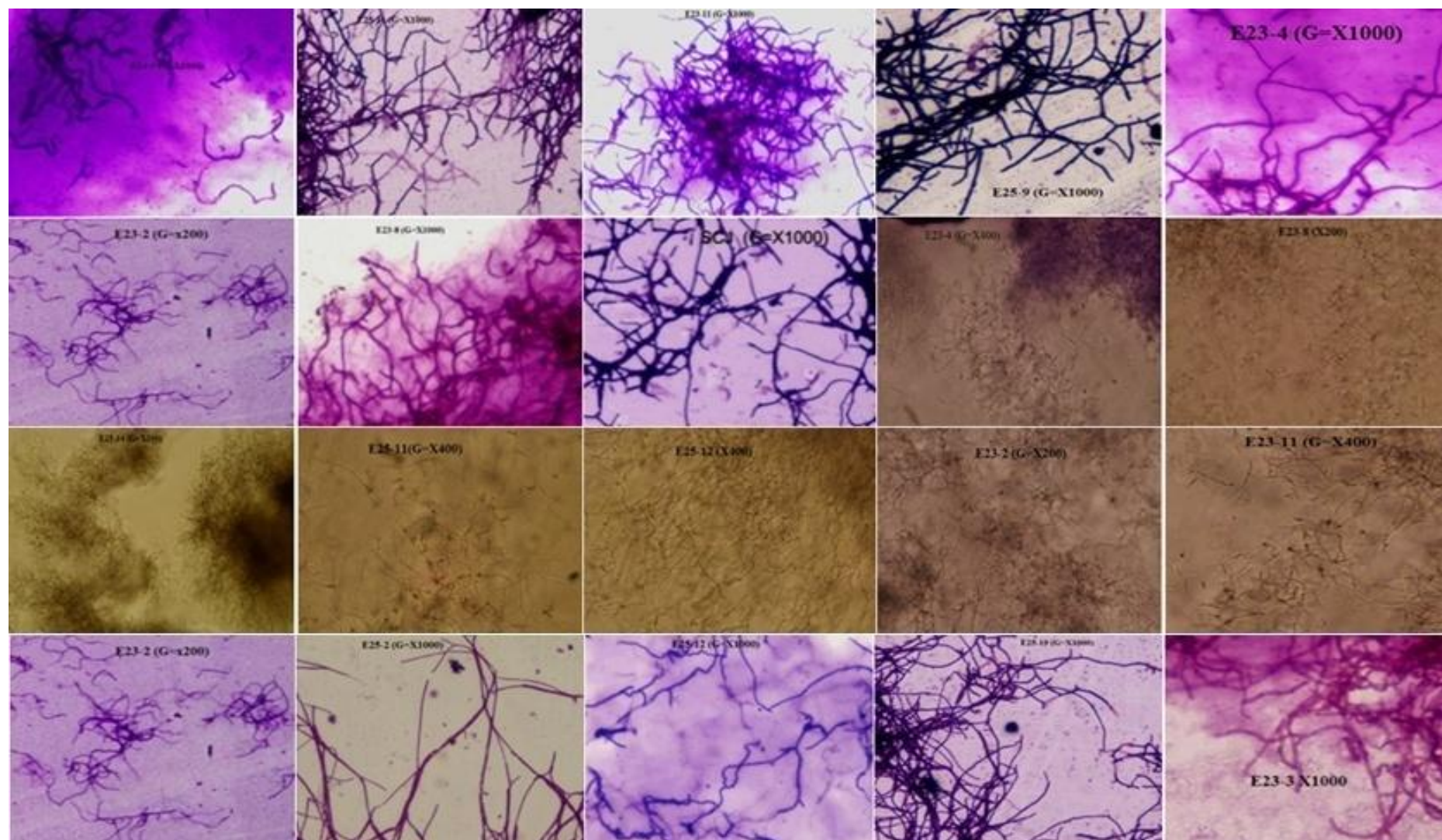
**Figure 15.** Photos des isolements des *Actinomycètes* dans les quatre sites A, B, C et D sur les milieux Bennett, GLM et M2 (dilutions  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  et  $10^{-4}$ ).

## Résultats et Discussions



**Figure 16.** Isolats d'*Actinomycètes* purs obtenus dans les quatre sites A, B, C et D sur milieu ISP2.

## Résultats et Discussions



**Figure 17.** Aspect microscopiques des isolats d'*Actinomycètes* après coloration de Gram

## Résultats et Discussions

### 1.3 Criblage des isolats d'*Actinomycètes* actifs

#### 1.3.1 Criblage primaire en milieu solide

Les colonies présentant des caractères morphologiques macroscopiques et microscopiques aux *Actinomycètes* (**Figure 16 et 17**) ont été sélectionnées pour tester leurs activités antimicrobiennes *vis-à-vis* 19 microorganismes cibles en utilisant la méthode de la double couche (**Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25 et 26**). Afin d'évaluer l'influence du milieu de culture sur la production de métabolites secondaires produits par les souches d'*Actinomycètes*, quatre milieux ont été utilisés (ISP1, ISP2, Bennett et GYEA). Les résultats obtenus sont présentés dans les **Figures 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 et 25**.

Parmi les 45 isolats d'*Actinomycètes* testés, seulement 18 isolats (40 %) ont montré une activité modérée à forte contre les bactéries à Gram positif (*Bacillus cereus* ATCC 14579, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923), les bactéries à Gram négatif (*Escherichia coli* ATCC 25922, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) (**Figures 18,19, 20, 21,22 et 23**), et toutes les souches fongiques testées (*Candida albicans* ATCC 60193, *Fusarium* sp. MN944566, *Fusarium* sp. MN944567, *Fusarium* sp. MN944568, *Fusarium* sp. MN944569, *Fusarium* sp. MN944570, *Fusarium* sp. MN 944571, *Fusarium* sp. MN944572, *Fusarium* sp. MN944573, *Fusarium* sp. MN944574, *Fusarium* sp. MN944575, *Fusarium* sp. MN944576, *Fusarium* sp. MN944577, *Trichoderma koningii* (M35) et *Trichoderma longibrachiatum* (M37)) (**Figures 24, 25 et 26**).

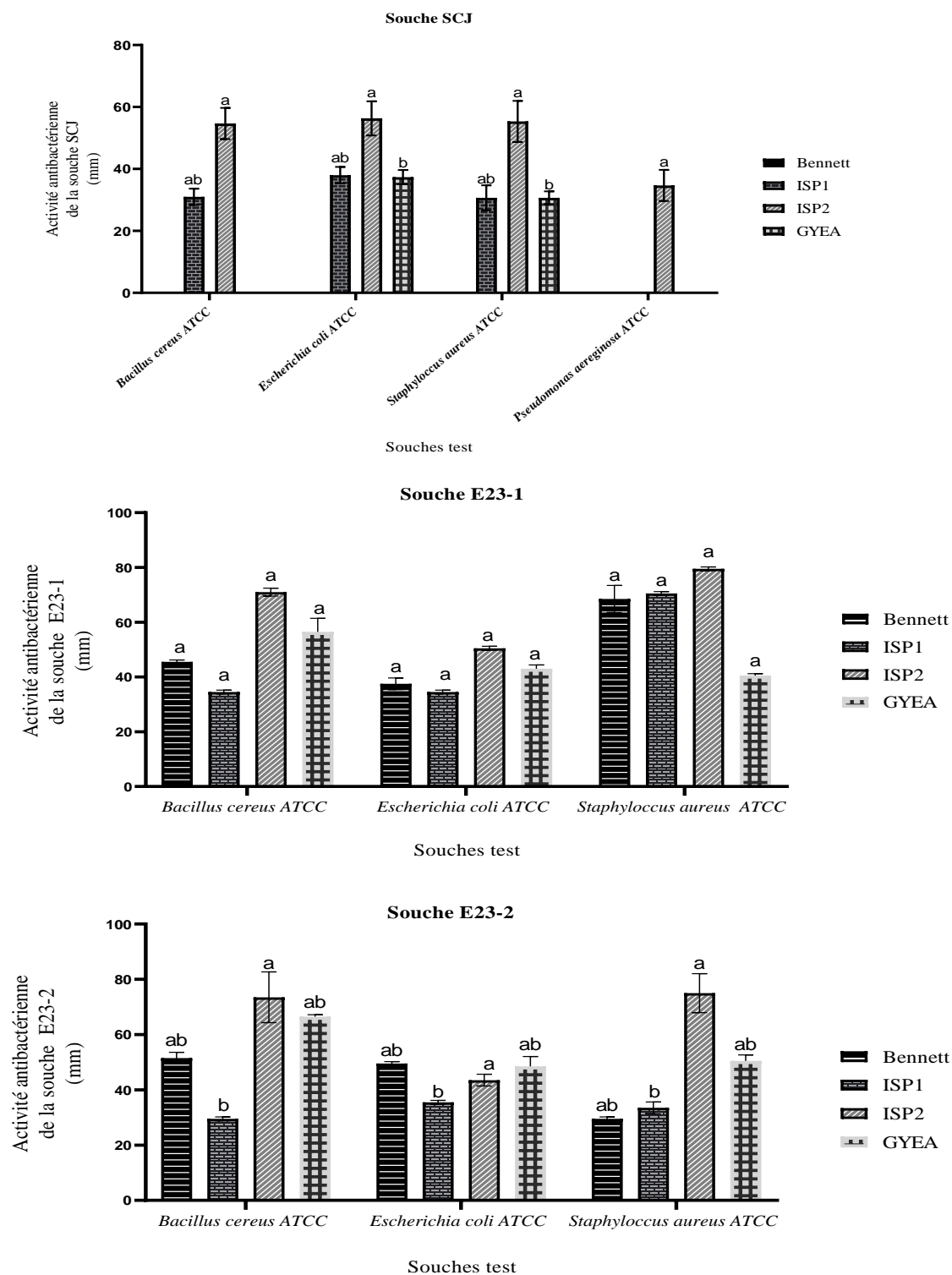
L'activité antibactérienne des isolats d'*Actinomycètes* est très importante sur les milieux gélosés testés (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA) avec cependant une meilleure production sur les milieux ISP2, Bennett et GYEA. En effet l'analyse statistique de la variance des résultats (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey) a montré une différence non significative entre ces milieux pour la plupart des isolats. Néanmoins, le milieu ISP2 a été retenu en tant que le meilleur milieu pour la production des métabolites secondaires à cause de grandes zones d'inhibition qu'il montre. Des résultats similaires ont été rapportés (Al-Dhabi et al., 2020; Badji et al., 2006; Rajivgandhi et al., 2019) qui ont obtenu de bons résultats avec l'utilisation de ce milieu ISP2.

Ces résultats nous ont donc conduit à choisir le milieu ISP2 comme milieu de production pour la suite de notre travail. De plus, le milieu ISP1 est le milieu le moins favorable à la production de métabolites secondaires pour tous les isolats ( $p < 0,001$ ). D'après les résultats

## Résultats et Discussions

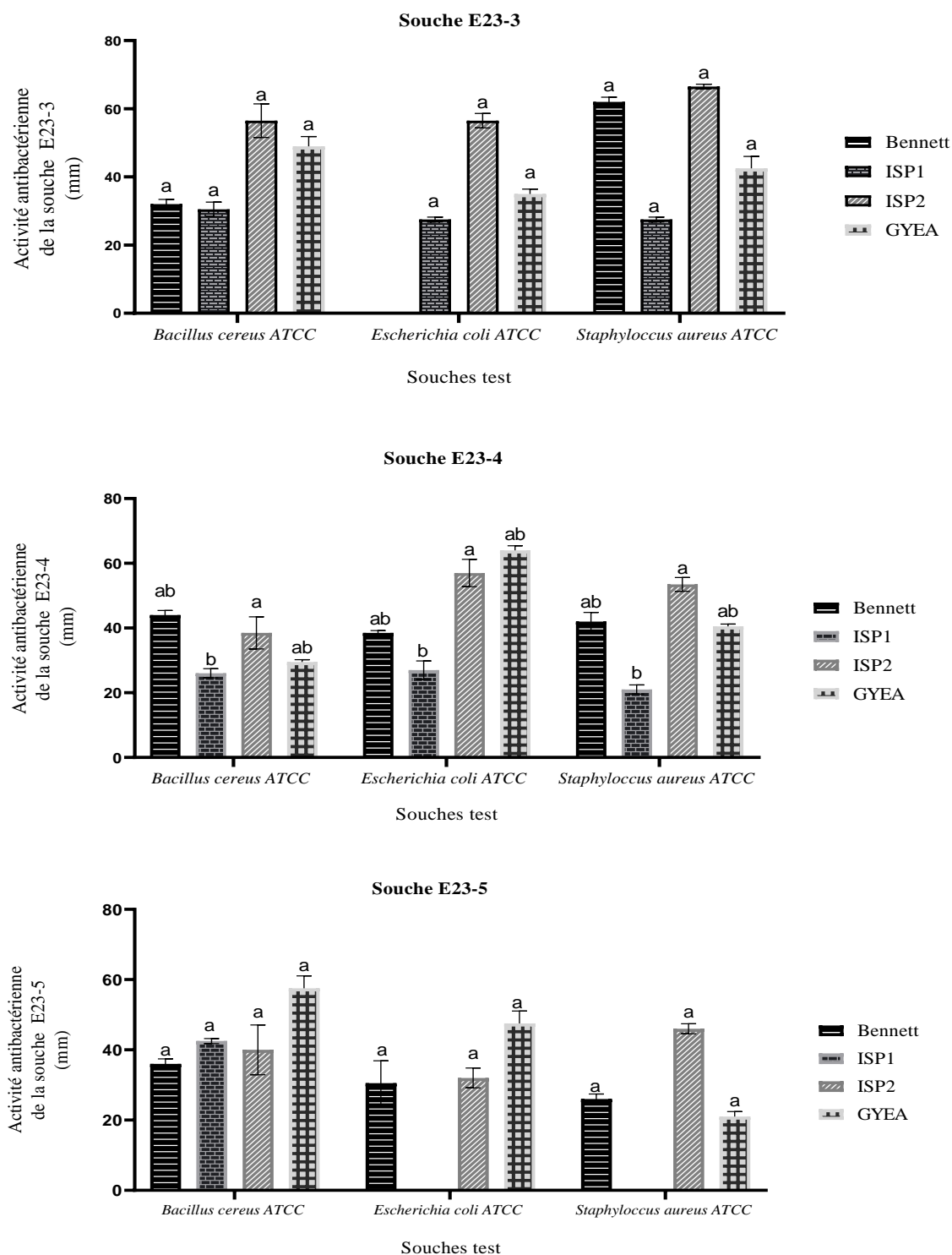
obtenus, on peut constater que la production de métabolites secondaires par les isolats d'*Actinomycètes* est influencée par la composition du milieu de culture. En effet, l'activité antimicrobienne est meilleure sur le milieu ISP2 (extrait de malt abondant) par rapport aux autres milieux (ISP1, GYEA et Bennett). Il apparaît clairement que les composants de l'extrait de malt ont joué un rôle important dans l'augmentation de cette activité antimicrobienne. Il est également possible que le glucose présent en grande quantité dans les milieux GYEA et Bennett (10 g/L contre 4 g/L pour ISP2) ait joué un rôle néfaste. Plusieurs chercheurs (Khadayat et al., 2020; Rajivgandhi et al., 2019), ont prouvé que le glucose à une forte concentration, exerce un effet répressif catabolique sur la production des antibiotiques mais pas sur les macrolides. Le milieu ISP1 semble être un milieu de production pauvre puisqu'il a montré des activités antimicrobiennes faibles, cela pourrait être expliqué par l'absence totale du glucose dans ce milieu. Pour la plupart des microorganismes producteurs d'antibiotiques, le glucose représente une source de carbone rapidement assimilable. En effet, la production des métabolites secondaires par les *Actinomycètes* dépend de la composition du milieu de culture (Singh et al., 2009) et surtout des sources de carbone et d'azote (Iwai and Omura, 1982).

## Résultats et Discussions



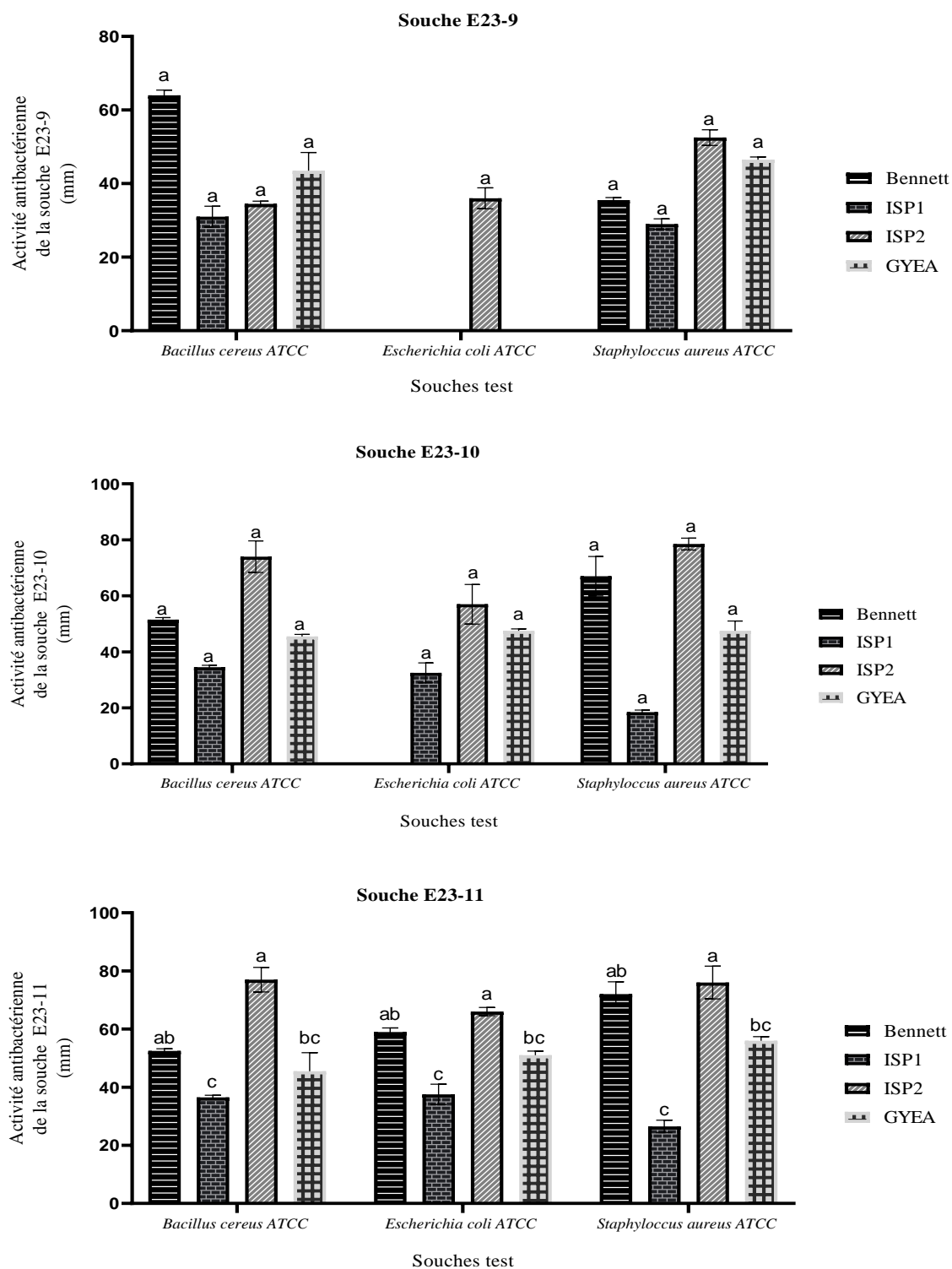
**Figure 18.** Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Résultats et Discussions



**Figure 19.** Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

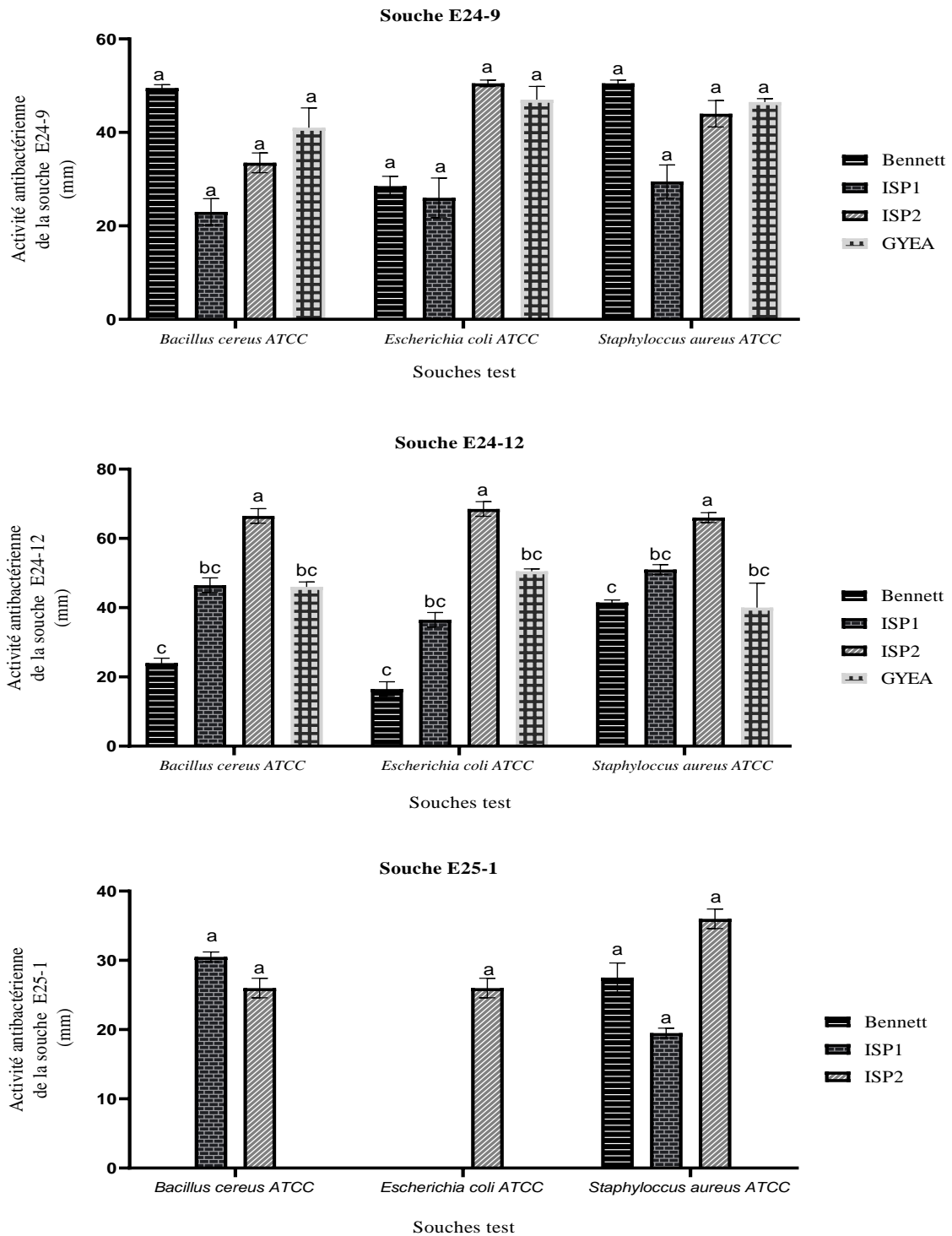
## Résultats et Discussions



**Figure 20.** Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

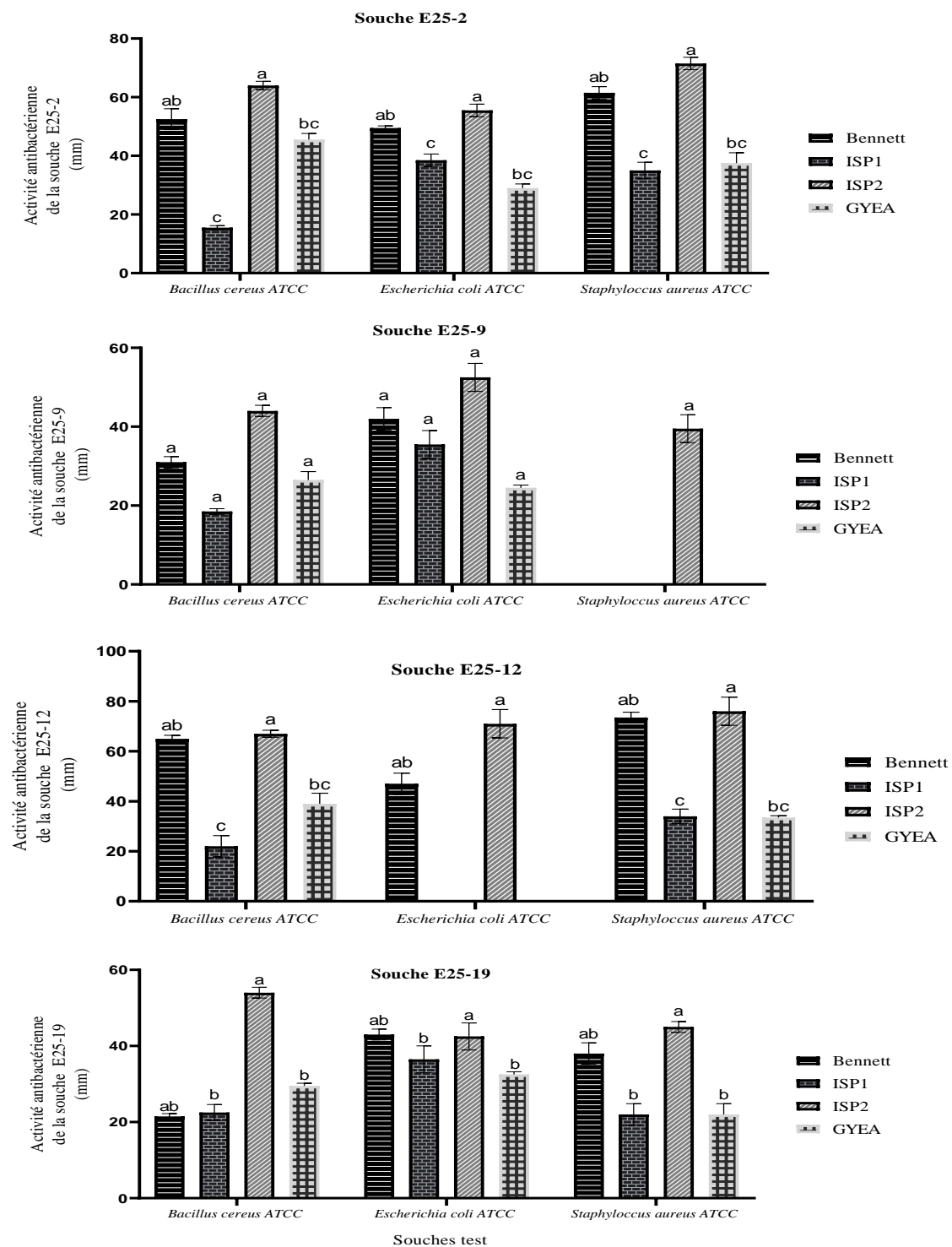


## Résultats et Discussions



**Figure 21.** Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Résultats et Discussions



**Figure 22.** Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de cultures (Bennett, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

# Résultats et Discussions

Zone d'inhibition

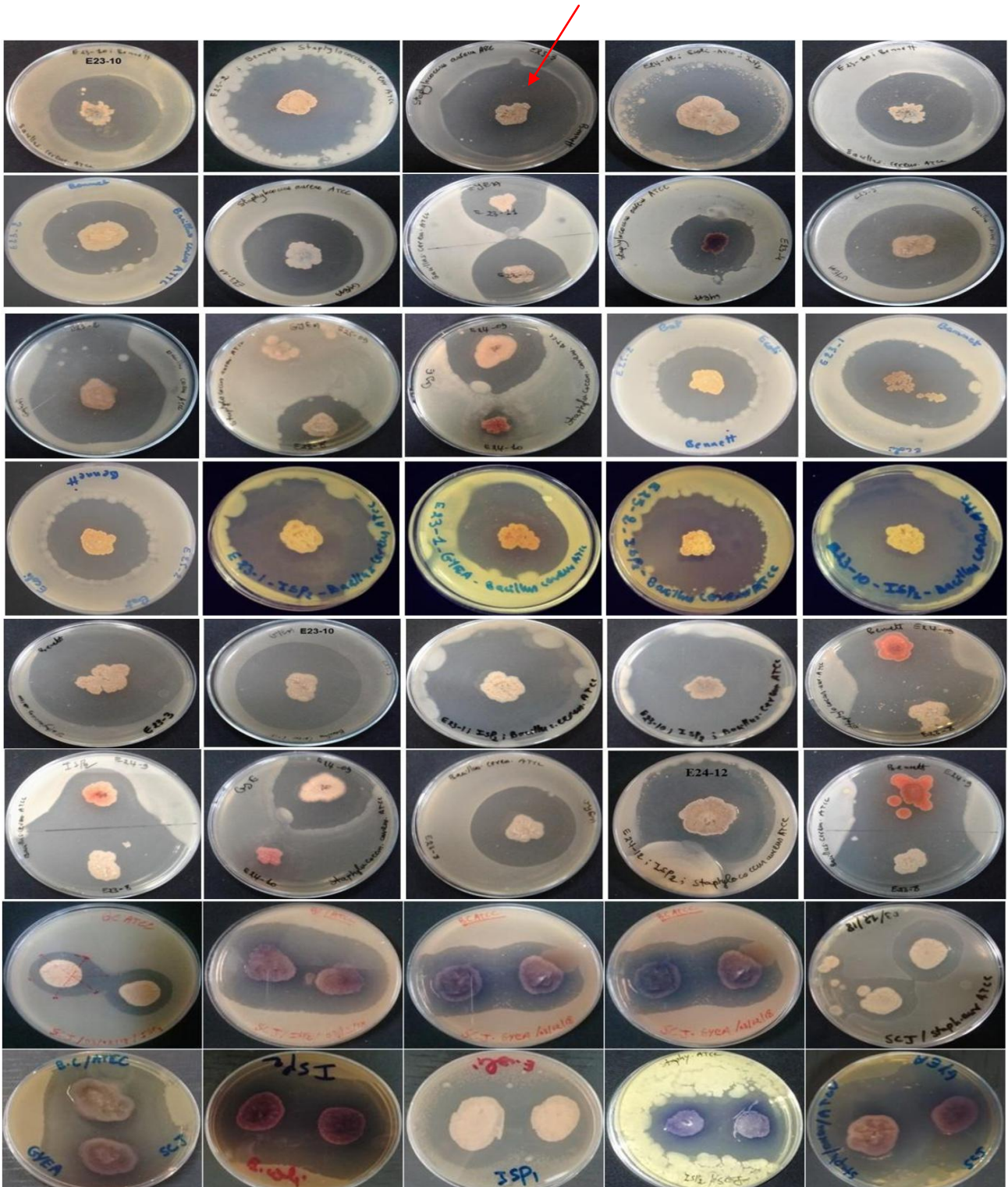
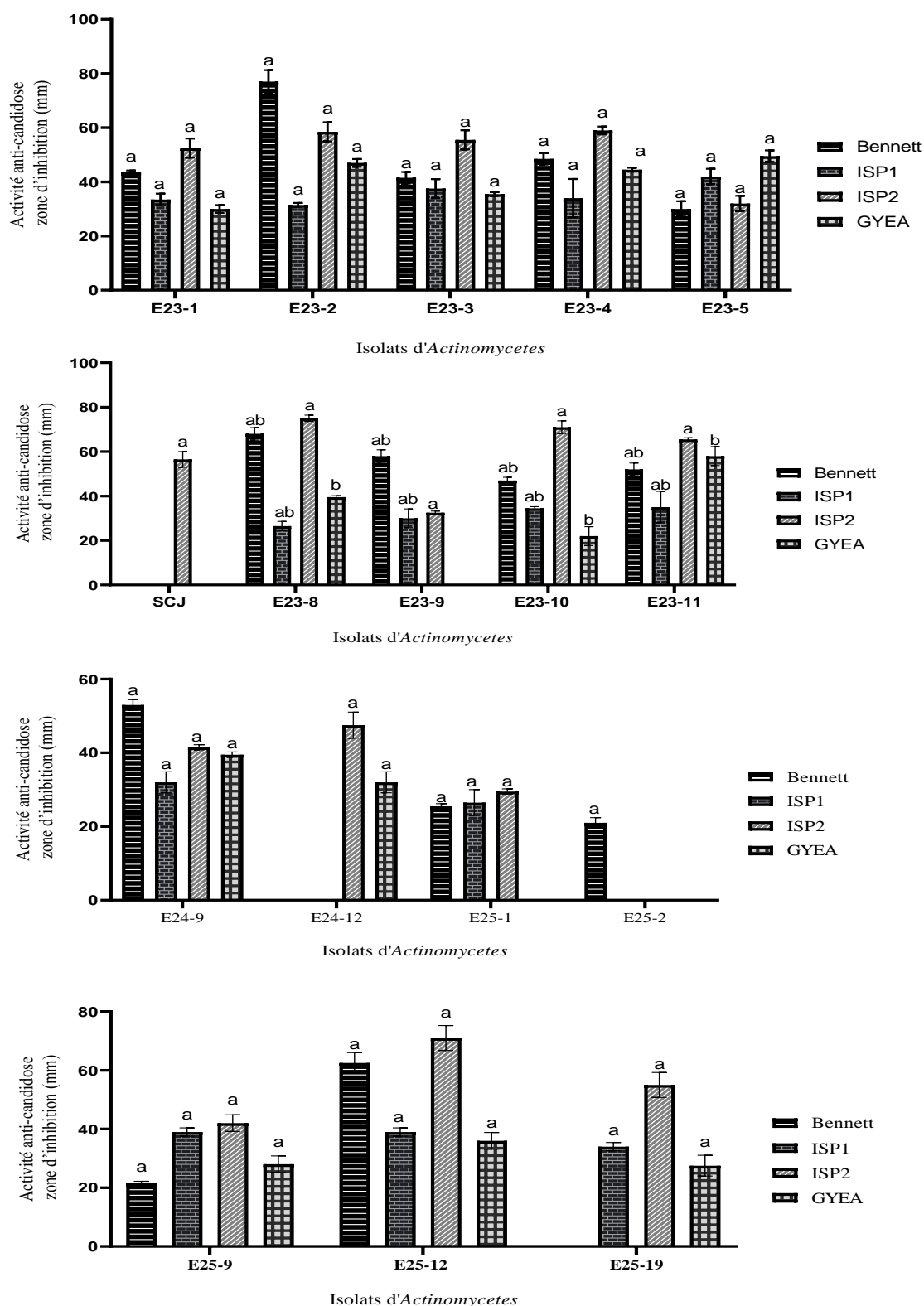


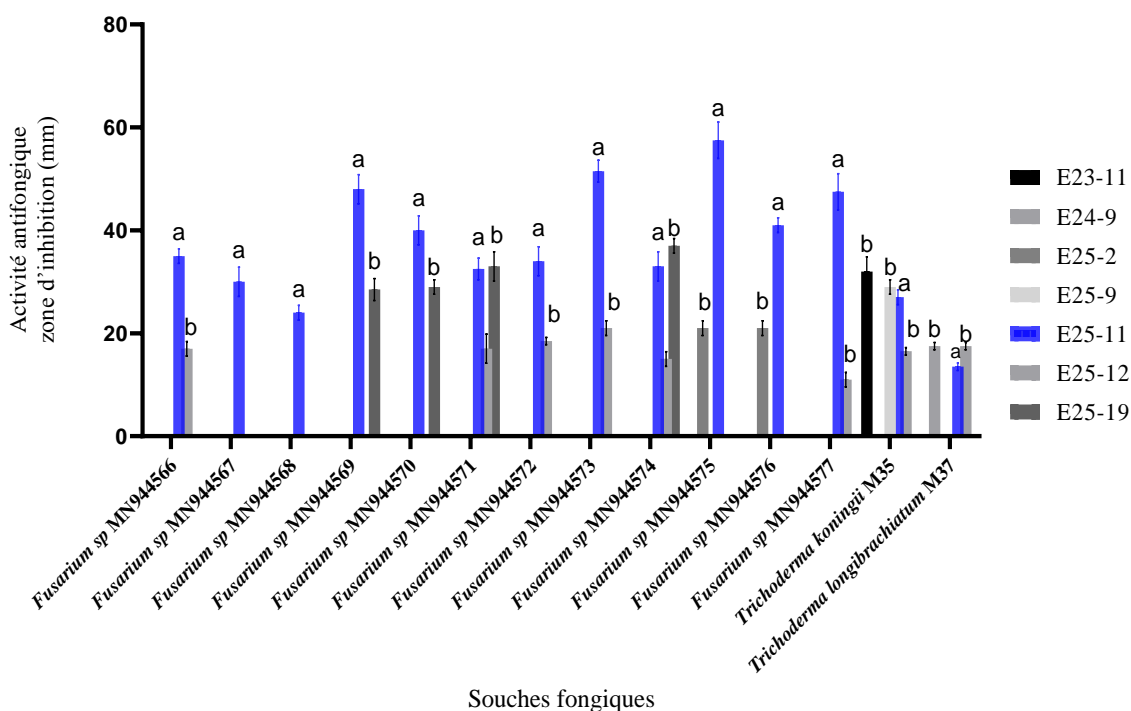
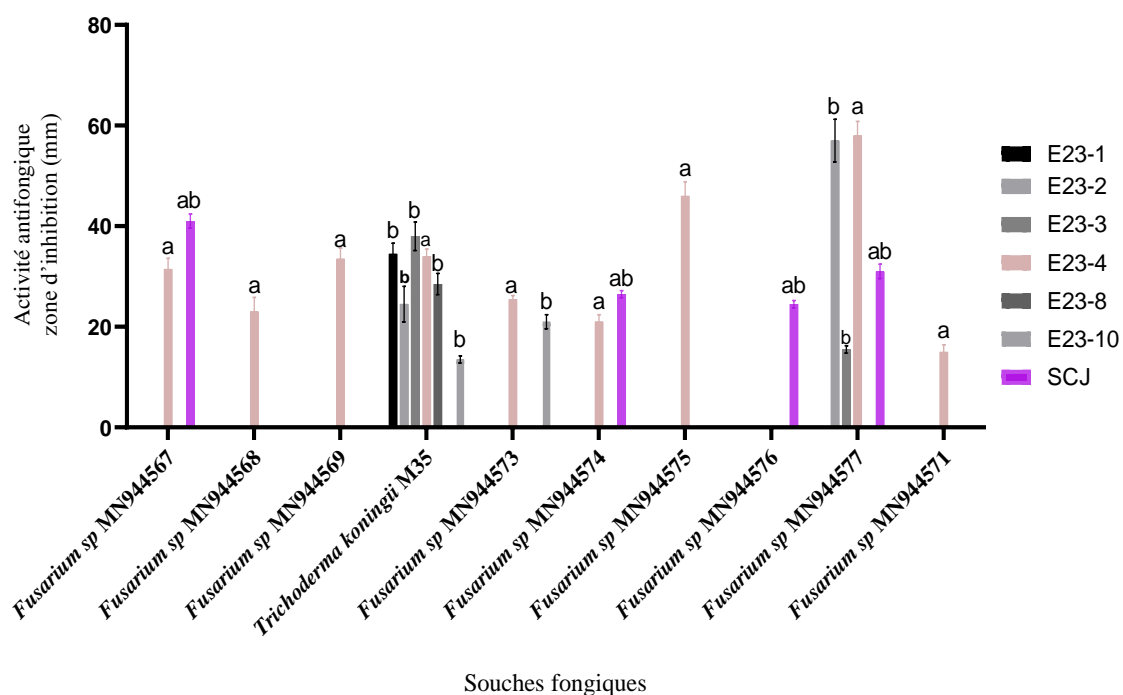
Figure 23. Criblage primaire (activité antibactérienne) par la méthode de la double couche sur quatre milieux (ISP1, ISP2, Bennett et GYEA).

## Résultats et Discussions



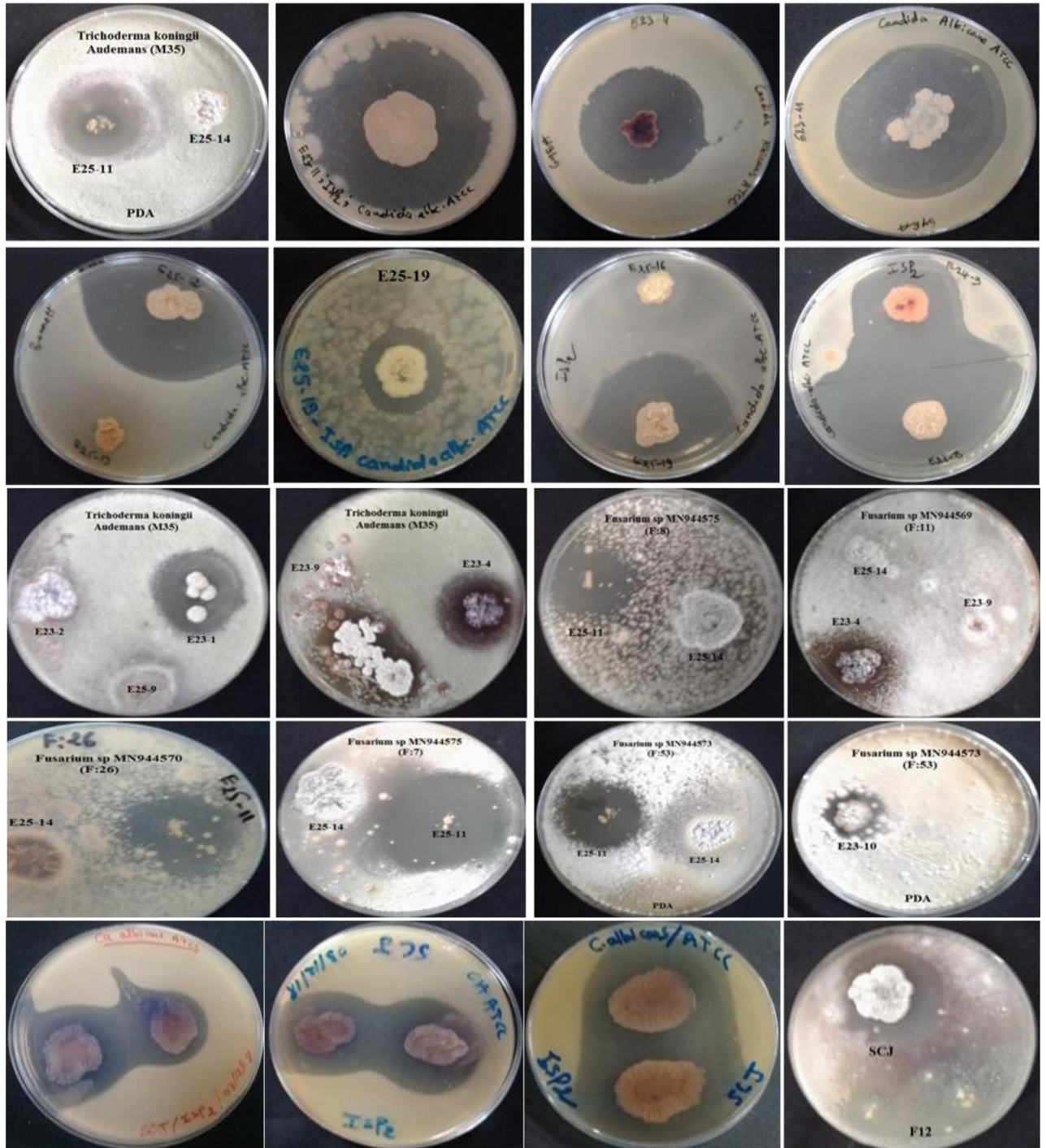
**Figure 24.** Criblage primaire (Activité anti-candidose) par la méthode de la double couche sur quatre milieux de culture (Bennet, ISP1, ISP2 et GYEA). Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaison multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Résultats et Discussions



**Figure 25.** Criblage primaire (Activité antifongique) par la méthode de la double couche sur milieu ISP2. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaison multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## Résultats et Discussions



**Figure 26.** Criblage primaire (activité antifongique) par la méthode de la double couche sur quatre milieux (ISP1, ISP2, Bennett et GYEA).

## Résultats et Discussions

### 1.3.2 Criblage secondaire en milieu liquide

Les 18 isolats bioactifs qui ont montré une activité antimicrobienne *vis-à-vis* au moins un microorganisme test dans le criblage primaire, ont été soumis à un criblage secondaire contre certaines bactéries pathogènes multirésistantes (BMR) (**Tableaux 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 19 ; Figures 27 et 28**), ainsi que contre des champignons phytopathogènes et pathogènes pour l'Homme (**Tableau 20 ; Figures 29 et 30**).

**Tableau 8.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat SCJ) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat SCJ (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>C</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	8,5±0,71	12±0	26,5±0,71	8,5±0,71
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	9,5±0,71	18±2,83	23±2,83	-
<i>Entérocoque clinique</i> 18k1386	25±0	-	13±1,41	16±1,41	-
<i>Staphylococcus aureus clinique</i> 18k1052	24±1,41	-	20,5±2,12	22±2,83	-
<i>Proeus vulgaris clinique</i> 16C1737	35,5±0,71	-	19±1,41	14,5±0,71	-
<i>Echerichia coli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	11,5±2,12	10±1,41	-
<i>Neisseria gonorrhoea clinique</i> 16D1170	25,5±2,12	-	-	9,5±0,71	-
<i>Escherichia coli clinique</i> 16D1150	27±1,41	-	18±2,83	19,5±2,12	-
<i>Klebsiella pneumoniae</i> 18K1514	26±1,41	-	-	15±1,41	5,5±2,12

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 9.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E23-2) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E23-2 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>A</sup>	AE <sup>A</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	14,5±4,95	24,5±3,53	21±0	15,5±3,53
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	11±0	24±1,41	20,5±0,71	15±0
<i>Entérocoque</i> clinique18k1386	25±0	11,5±0	25±1,41	19,5±0,71	10,5±0,71
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique18k1052	24±1,41	-	22,5±0,71	15±1,41	10±2,83
<i>Proeus vulgaris</i> clinique16C1737	35,5±0,71	25±1,41	25,5±0,71	31±1,41	25±1,41
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	10±0	25,5±0,71	22,5±0,71	14,5±2,12
<i>Neisseria</i> gonorrhoeclinique16D1170	25,5±2,12	-	-	-	7±0
<i>Escherichia coli</i> clinique 16D1150	27±1,41	-	22,5±0,71	19±1,4	-

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.



## Résultats et Discussions

**Tableau 10.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E23-3) par méthode de diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E23-3 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	-	-	-	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	-	-	-	-
<i>Entérocoque</i> clinique18k1386	25±0	-	18±2,82	12±1,41	10,5±0,71
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique18k1052	24±1,41	-	16,5±2,12	9±1,41	7±1,41
<i>Proeus vulgaris</i> clinique16C1737	35,5±0,71	-	12±1,41	12±1,41	12±1,41
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	-	-	-
<i>Neisseria</i> gonorrhoeclinique16D1170	25,5±2,12	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> clinique 16D1150	27±1,41	-	17,5±3,54	11±1,41	8,8±2,12

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 11.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E23-4) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E23-4 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>B</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	-	13,5±0,71	11,5±0,71	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	-	14,5±0,71	14,5±0,71	8,5±0,71
<i>Entérocoque clinique</i> 18k1386	25±0	-	14,5±0,71	15±0	7,5±0,71
<i>Staphylococcus aureus clinique</i> 18k1052	24±1,41	7,5±0,71	14±1,41	25±1,41	12,5±0,71
<i>Proeus vulgaris clinique</i> 16C1737	35,5±0,71	-	20±1,41	17,5±2,12	12±1,41
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	10±0	11,5±0,71	-
<i>Neisseria gonorrhoea</i> clinique16D1170	25,5±2,12	7,5±0,71	8±0	7±0	8,5±0,71
<i>Escherichia coli clinique</i> 16D1150	27±1,41	8,5±0,71	24,5±0,71	21±1,41	12±1,41

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A et B sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 12.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E23-8) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E23-8 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>A</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	11,5±0,71	21,5±0,71	18,5±2,12	10,5±0,71
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	12,5±3,53	23±0	18,5±0,71	10,5±0,71
<i>Entérocoque</i> clinique18k1386	11±1,41	8,5±0,71	20,5±0,71	14,5±0,71	8,5±0,71
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique18k1052	24±1,41	8±0	19±1,41	14±1,41	6,5±0,71
<i>Proeus vulgaris</i> clinique16C1737	35,5±0,71	18,5±2,12	28±1,41	31,5±2,12	21±1,41
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	13,5±0,71	25±1,41	19,5±0,71	9±2,83
<i>Neisseria</i> gonorrhoeclinique16D1170	25,5±2,12	-	-	-	6,5±0,71
<i>Escherichia coli</i> clinique 16D1150	27±1,41	11,5±3,54	22±2,83	17±1,41	-

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 13.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E23-10) par méthode de diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E23-10 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>B</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	-	16,5±2,12	9,5±0,71	8,5±0,71
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	-	14,5±0,71	8,5±0,71	-
<i>Entérocoque</i> clinique18k1386	11±1,41	-	10±1,41	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique18k1052	24±1,41	-	11±2,38	-	-
<i>Proeus vulgaris</i> clinique16C1737	35,5±0,71	10,5±0,71	22,5±0,71	11,5±2,12	-
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	8±1,41	19±1,41	10±1,41	6±1,41
<i>Neisseria</i> gonorrhoeclinique16D1170	25,5±2,12	-	-	-	7,5±0,71
<i>Escherichia coli</i> clinique 16D1150	27±1,41	-	11,5±0,71	6,5±0,71	-

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A et B sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 14.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E23-11) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E23-11 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	15,5±0,71	19,5±0,71	19,5±0,71	14±0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	11,5±0,71	21,5±0,71	16±0	14,5±0,71
<i>Entérocoque clinique</i> 18k1386	11±1,41	14±1,41	19±1,41	20,5±0,71	9±1,41
<i>Staphylococcus aureus clinique</i> 18k1052	24±1,41	13±1,41	18±1,41	16±1,41	11±1,41
<i>Proeus vulgaris clinique</i> 16C1737	35,5±0,71	16±1,41	26,5±2,12	30±2,83	24,5±3,53
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	13,5±0,71	20,5±0,71	18±1,41	11,5±0,71
<i>Neisseria gonorrhoea</i> clinique16D1170	25,5±2,12	-	-	-	-
<i>Escherichia coli clinique</i> 16D1150	27±1,41	13,5±0,71	15±1,41	17±2,83	12,5±0,71

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 15.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E24-9) par méthode de diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E24-9 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>B</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	-	13±1,41	8,5±0,71	11±2,82
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	-	14±0	9±0	11±1,41
<i>Entérocoque</i> clinique18k1386	11±1,41	-	7±0	-	9±0
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique18k1052	24±1,41	-	10,5±0,72	-	7,5±0,71
<i>Proeus vulgaris</i> clinique16C1737	35,5±0,71	-	17,5±	24±4,24	20,5±6,36
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	12,5±0,71	8±0	9,5±3,53
<i>Neisseria</i> gonorrhoeclinique16D1170	25,5±2,12	-	-	-	11,5±0,71
<i>Escherichia coli</i> clinique 16D1150	27±1,41	-	10,5±0,72	7,5±0,71	8,5±0,71

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A et B sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 16.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E25-2) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E25-2 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>B</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	-	-	10,5±0,71	-
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	-	-	11,5±0,71	-
<i>Entérocoque clinique</i> 18k1386	11±1,41	-	-	10,5±0,71	-
<i>Staphylococcus aureus clinique</i> 18k1052	24±1,41	-	-	11±0	-
<i>Proeus vulgaris clinique</i> 16C1737	35,5±0,71	11±1,41	12,5±0,71	25±1,41	23,5±2,12
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	-	13,5±0,71	-
<i>Neisseria gonorrhoea clinique</i> 16D1170	25,5±2,12	-	-	6,5±0,71	-
<i>Escherichia coli clinique</i> 16D1150	27±1,41	12,5±0,71	9,5±0,71	10,5±0,71	8,5±0,71

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A et B sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

**Tableau 17.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E25-9) par méthode de diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E25-9 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>A</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	14±1,41	22,5±0,71	13,5±0,71	9±0
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	14,5±0,71	22±2,83	14,5±0,71	11±1,41
<i>Entérocoque</i> clinique18k1386	11±1,41	9±1,41	19,5±0,71	14±1,41	9±1,41
<i>Staphylococcus aureus</i> clinique18k1052	24±1,41	7,5±0,71	16,5±0,71	11,5±0,71	8±0
<i>Proeus vulgaris</i> clinique16C1737	35,5±0,71	21±0	36,5±2,12	23±1,41	20,5±0,71
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	14,5±0,71	21,5±0,71	16±1,41	10±1,41
<i>Neisseria</i> gonorrhoeclinique16D1170	25,5±2,12	7±0	7,5±0,71	6±1,41	8±1,41
<i>Escherichia coli</i> clinique 16D1150	27±1,41	11±2,38	30,5±0,71	26±1,41	10,5±0,71

Les valeurs exprimées sont des moyennes  $\pm$  SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.



## Résultats et Discussions

**Tableau 18.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E25-11) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E25-11 (mm)				
	CP <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>B</sup>	AE <sup>C</sup>	But <sup>B</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	-	17,5±0,71	-	20,5±4,94
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	7±0	19,5±4,95	-	20±5,66
<i>Entérocoque clinique</i> 18k1386	11±1,41	-	-	-	10±0
<i>Staphylococcus aureus</i> <i>clinique</i> 18k1052	24±1,41	-	-	-	9,5±0,71
<i>Proeus vulgaris</i> <i>clinique</i> 16C1737	35,5±0,71	12,5±0,71	14,5±0,71	18,5±0,71	24±1,41
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	18±1,41	8±0	10,5±0,71
<i>Neisseria</i> <i>gonorrhoeclinique</i> 16D1170	25,5±2,12	-	-	-	14,5±0,71
<i>Escherichia coli clinique</i> 16D1150	27±1,41	7±0	26,5±0,71	-	-

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.

## Résultats et Discussions

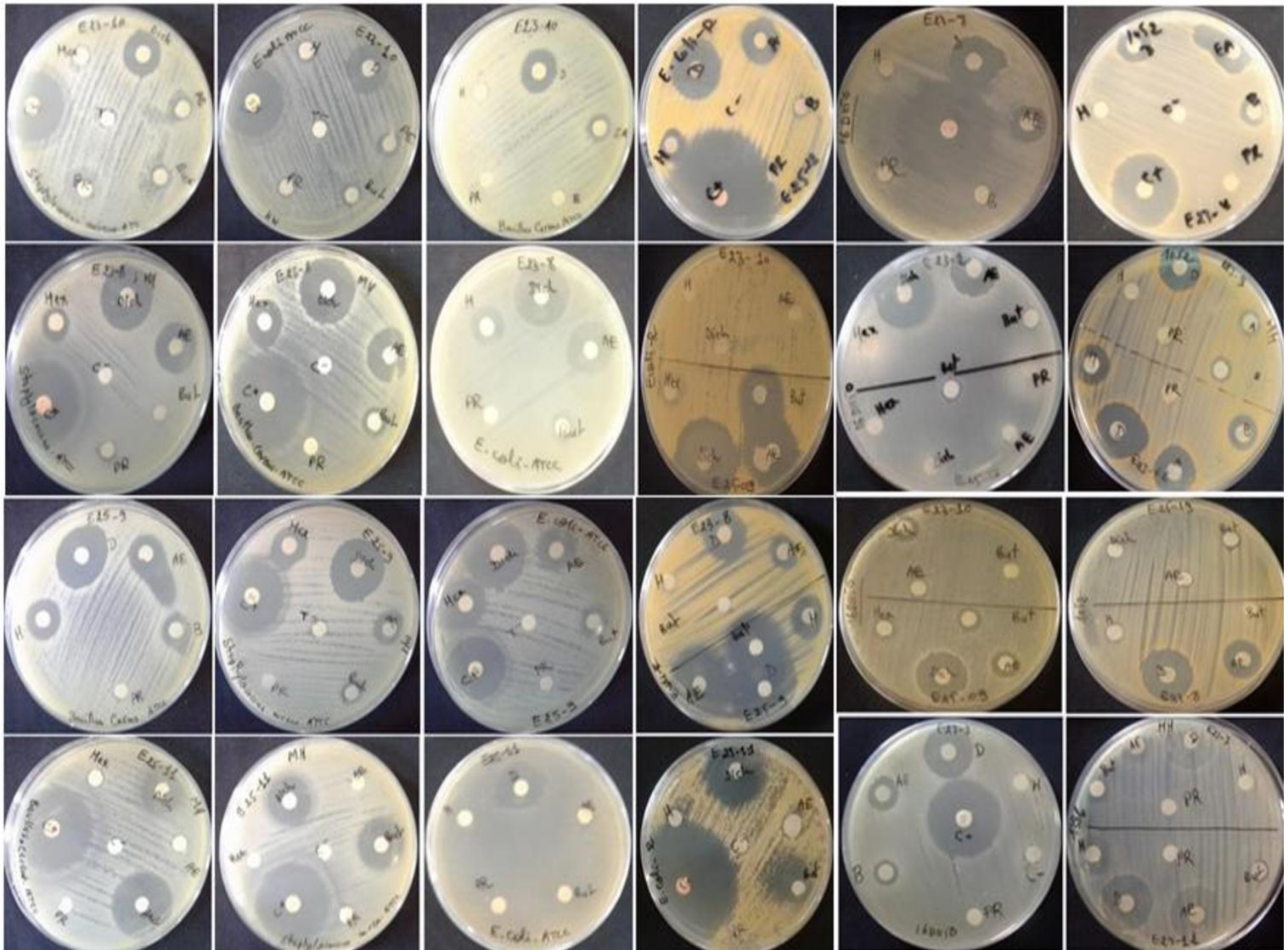
**Tableau 19.** Dépistage secondaire (Activité antibactérienne de l'isolat E25-12) par méthode diffusion sur disque en fonction des solvants d'extraction.

Souches cibles	Activité antibactérienne de l'isolat E25-12 (mm)				
	Stry (+) <sup>A</sup>	Hex <sup>C</sup>	Dich <sup>A</sup>	AE <sup>B</sup>	But <sup>C</sup>
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	27,5±2,12	10,5±0,71	17,5±0,71	12,5±0,71	8,5±0,71
<i>Bacillus cereus</i> ATCC 14579	28±4,24	11,5±0,71	19±1,41	17,5±0,71	12,5±0,71
<i>Entérocoque clinique</i> 18k1386	11±1,41	11±1,41	25±1,41	23±1,41	10,5±0,71
<i>Staphylococcus aureus clinique</i> 18k1052	24±1,41	12,5±0,71	23±2,83	19,5±0,71	-
<i>Proeus vulgaris clinique</i> 16C1737	35,5±0,71	20,5±2,12	35,5±2,12	15±1,41	32±2,82
<i>Echerichiacoli</i> ATCC 25922	28±1,41	-	-	-	-
<i>Neisseria gonorrhoeclinique</i> 16D1170	25,5±2,12	-	7,5±0,71	-	-
<i>Escherichia coli clinique</i> 16D1150	27±1,41	15,5±0,71	23,5±2,12	19±1,41	10,5±0,71

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 2). Les colonnes avec des lettres différentes A, B et C sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05). **CP** : Contrôle positif (Streptomycine), **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, "-" aucune zone d'inhibition.



## Résultats et Discussions



**Figure 28.** Criblage secondaire (activité antibactérienne) par la méthode de diffusion en disques sur milieu MH en fonction des solvants d'extraction.

## Résultats et Discussions

**Tableau 20.** Criblage secondaire (activité antifongique) par la méthode de diffusion en disques.

Souches test	Extraits dichlorométhaniques des isolats actifs d' <i>Actinomycètes</i> (zone d'inhibition en mm)										
	SCJ	E23- 2	E23-3	E23-4	E23-8	E23-10	E23-11	E25-9	E25-11	E25-12	CP
<i>Candida albicans</i> ATTC 60193	13±1,41	22,5±0,71	-	21,5±0,71	125±0,71	17,5±2,12	19,5±0,71	22±1,41	16,5±2,12	20,5±0,71	27±2,83
<i>Fusarium sp</i> MN944577	33±2,83	18,5±2,12	22±2,82	-	13,5±2,12	-	22±1,41	-	19±1,41	-	31,5±0,71
<i>Fusarium sp</i> MN944571	-	-	-	-	-	-	20,5±0,71	-	14,5±0,71	-	19,5±0,71
<i>Fusarium sp</i> MN944567	9,5±0,71	11±1,41	-	-	-	-	-	-	-	-	28,5±2,12
<i>Fusarium sp</i> MN944568	18,5±2,12	-	-	16±2,82	-	-	-	-	-	-	27±1,41
<i>Fusarium sp</i> MN944569	9,5±0,71	-	10,5±0,71	-	-	-	14,5±0,71	-	9,5±0,71	-	27,5±0,71
<i>Fusarium sp</i> MN944570	13±0	-	9,5±0,71	-	-	-	19,5±2,12	-	-	-	26,5±0,71
<i>Trichoderma</i> <i>koningii</i> (M35)	-	-	-	-	-	-	21±1,41	-	16,5±2,12	-	16,5±2,12

"-" aucune zone d'inhibition, CP : Contrôle positif (Cycloheximide), diamètre du disque : 6mm

Résultats et Discussions

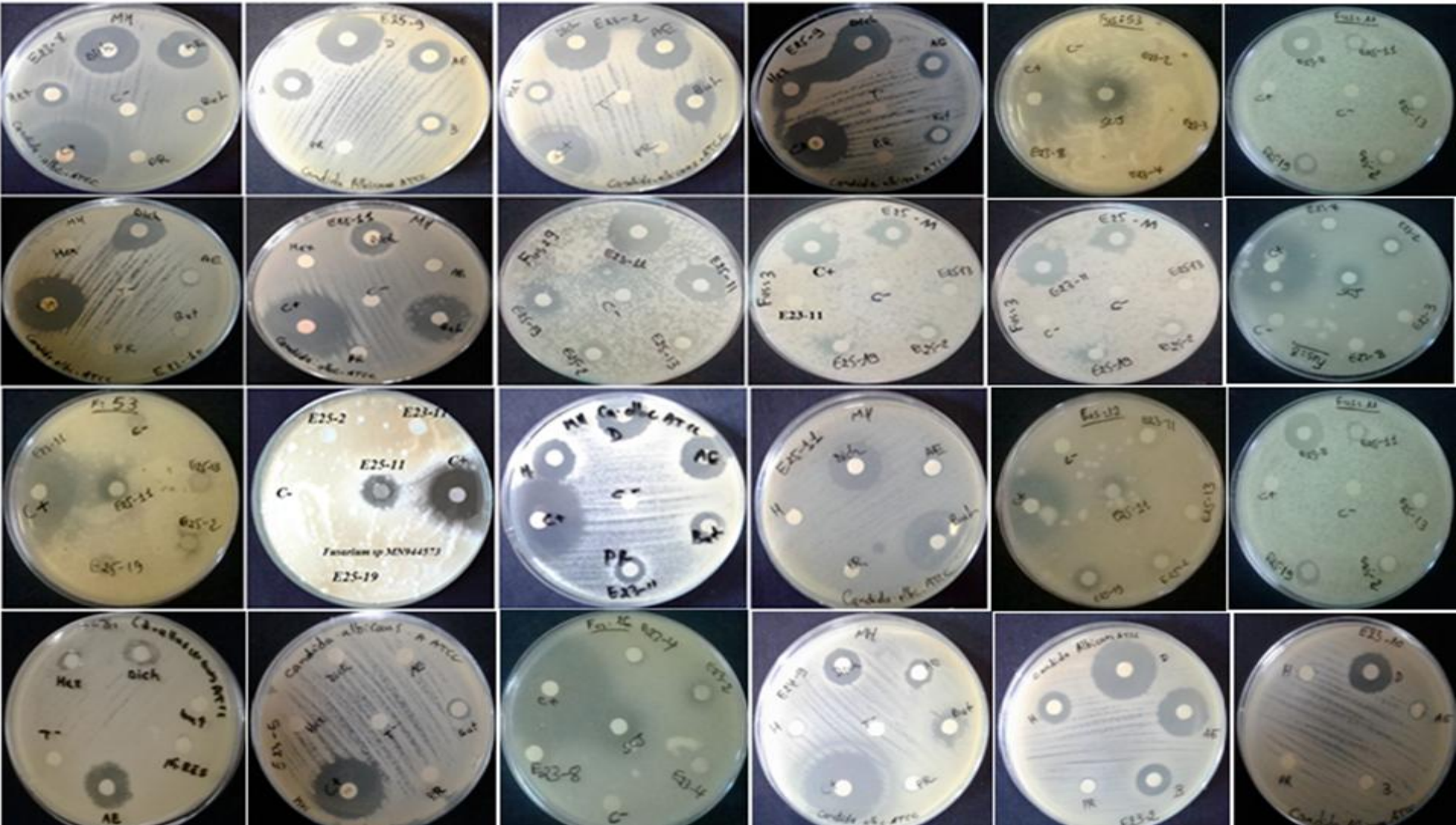
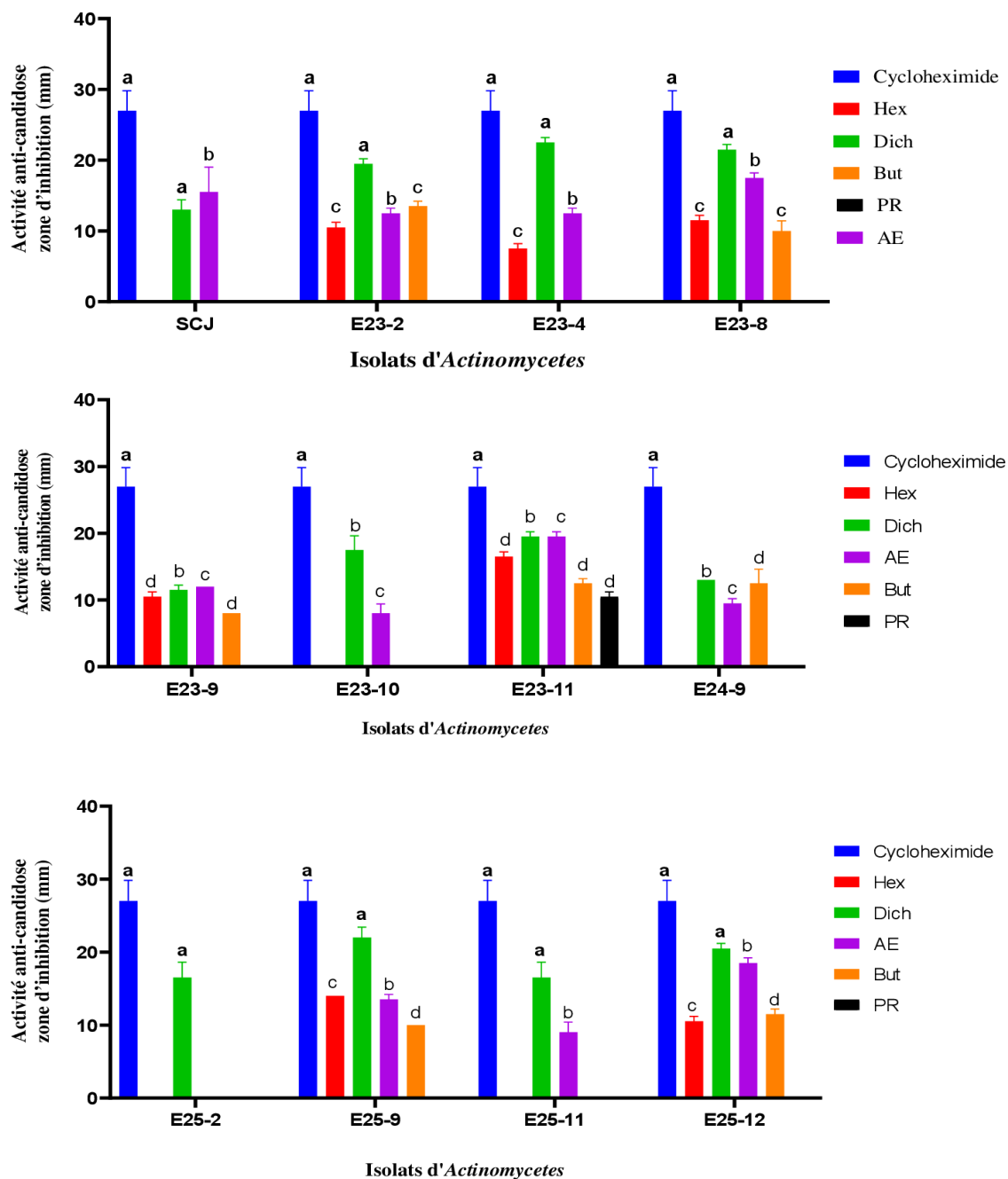


Figure 29. Criblage secondaire (activité antifongique) par la méthode de diffusion en disques sur milieu Muller Hinton (MH).

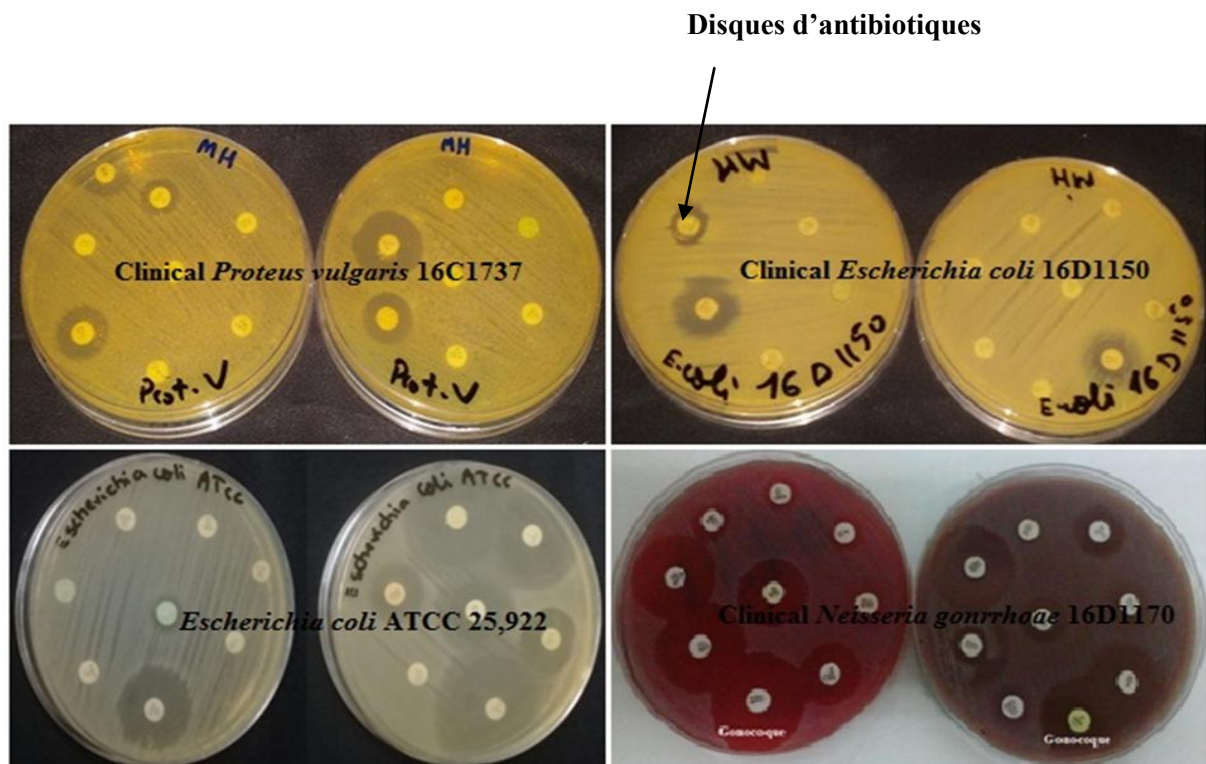
## Résultats et Discussions



**Figure 30.** Activité anti-candidose en fonction des solvants d'extraction. Les valeurs sont la moyenne de deux mesures parallèles. Les colonnes avec des lettres différentes (a, b, c et d) sont significativement différentes (Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ ). **Contrôle positif** : Cycloheximide, **Hex** : Hexane, **Dich** : Dichlorométhane, **AE** : Acétate d'éthyle, **But** : Butanol, **PR** : Phase résiduelle.

## Résultats et Discussions

Les résultats du criblage primaire et secondaire ont révélé que la majorité des isolats d'*Actinomycètes* testés étaient plus actifs contre les bactéries à Gram positif par rapport aux bactéries à Gram négatif. Cette différence pourrait être expliquée par la complexité de la paroi des bactéries à Gram négatif par rapport à celle des bactéries à Gram positif. Les parois cellulaires des bactéries à Gram négatif contiennent des lipopolysaccharides (LPS) comme principal composant structurel, qui sont ancrés dans la couche phospholipidique, rendant la paroi imperméable aux solutés lipophiles (Naikpatil and Rathod, 2011; ZainalAbidin et al., 2016). En revanche, les parois des bactéries à Gram positif sont principalement constituées de peptidoglycane qui ne constitue pas une barrière de perméabilité efficace, rendant les bactéries à Gram positif sensibles aux métabolites (Naikpatil and Rathod, 2011; ZainalAbidin et al., 2016). Toutes les bactéries cliniques testées étaient multirésistantes aux antibiotiques (**Tableau 4, Figure 31**), mais aucune d'entre elles n'était résistante aux extraits organiques des isolats d'*Actinomycètes* testés. Ceci suggère que ces isolats d'*Actinomycètes* sécrètent des antibiotiques différents de ceux auxquels les bactéries sont résistantes.



**Figure 31.** Profil de résistance des bactéries cliniques multirésistantes (BMR).



## Résultats et Discussions

### 1.3.2.1 Cinétique de production de métabolites secondaires

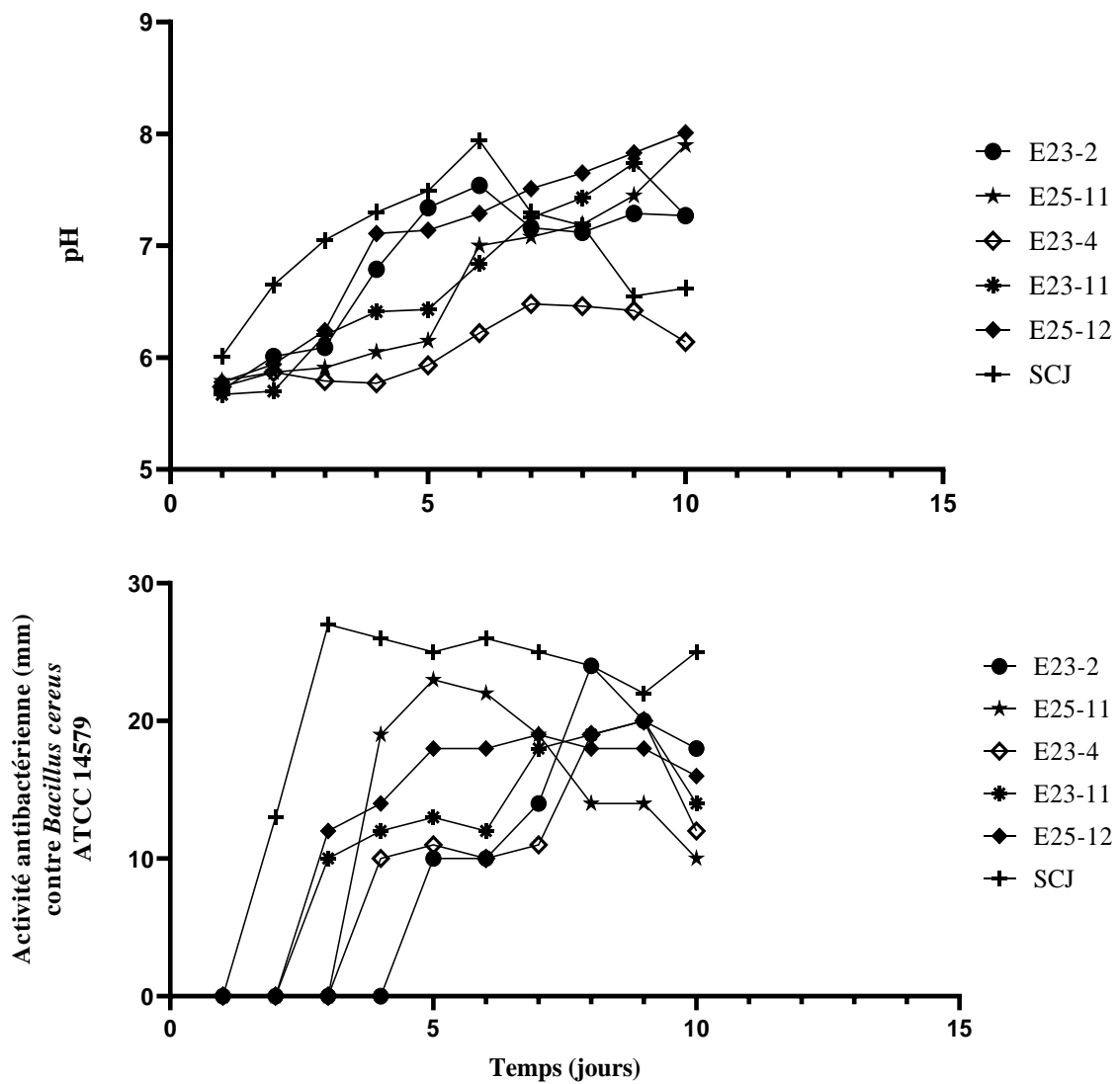
La cinétique de production des métabolites secondaires et de l'évolution du pH réalisées par méthode de diffusion en puits sur milieu ISP2 liquide, sont représentées sur la **Figure 32 et 33**. Nous avons remarqué que les activités antibactériennes ont commencé un jour après l'incubation pour la souche SCJ, deux jours après l'incubation pour les souches E25-12 et E23-11, trois jours après l'incubation pour les souches E25-11 et E23-4, et après quatre jours pour la souche E23-2.

Pendant la période d'incubation, la cinétique de l'évolution du pH a montré une légère variation entre (5,67 et 8,01). Ce changement de pH pourrait être lié à la dégradation des sources organiques d'azote, comme les acides aminés présents dans les extraits de levure, de peptones présentes dans l'extrait de malt qui sont désaminés pour libérer de l'ammonium (Vassallo et al., 2020). L'accumulation de ce dernier alcalinise le milieu durant l'incubation (Vassallo et al., 2020).

La production maximale de métabolites secondaires pour les souches SCJ et E25-11 apparaît au 5<sup>ème</sup> et au 6<sup>ème</sup> jour après l'incubation. Pour la souche E23-2, la production maximale d'antibactériens est au 7<sup>ème</sup> jour après l'incubation. Une autre production maximale de métabolites pour la souche E23-11 apparaît au 9<sup>ème</sup> jour après l'incubation c'est-à-dire pendant la phase stationnaire. On remarque que la production de métabolites commence au début de la phase stationnaire pour tous les isolats. Les cinétiques de production des métabolites secondaires présentent plusieurs maximas. Cela suggère que les souches d'*Actinomycètes* produisent une variété de substances qui sont soit des dérivés les uns des autres, soit d'autres groupes de substances, soit éventuellement des spectres d'activité différents (Fan et al., 2010).

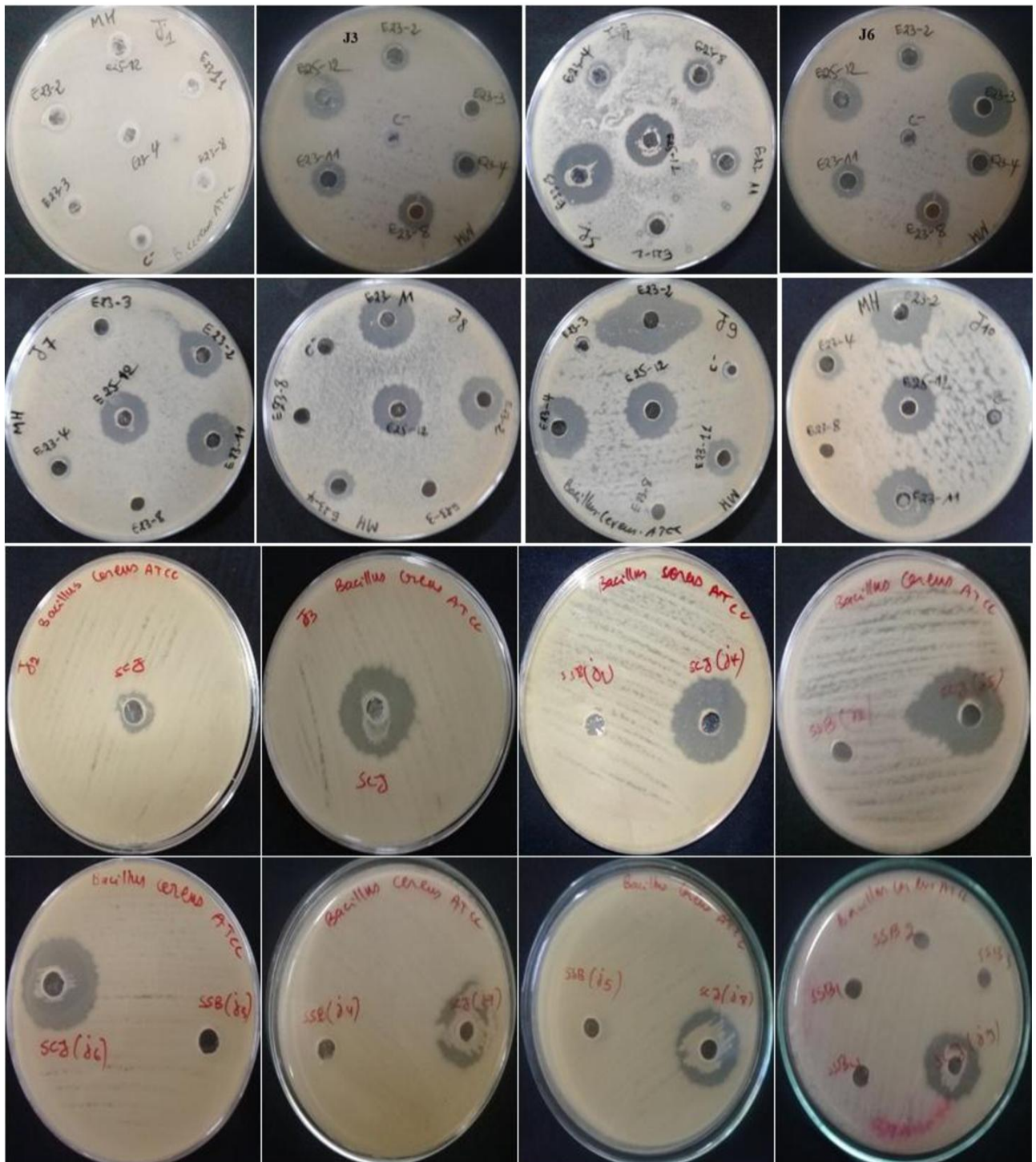
La production des antibiotiques chez les *Streptomyces* commence généralement au début de la phase stationnaire dans les cultures en milieu liquide (Bibb and Hesketh, 2009). En réponse à un stress, tel que l'épuisement en nutriments, une partie du mycélium est sacrifiée par autolyse via la mort cellulaire programmée, cela permet la libération de nutriments qui seront utilisés pour la formation d'hyphes aériens et de spores, le début de la sporulation est lié avec la production de métabolites secondaires (van der Meij et al., 2017). Cette production peut commencer durant la phase exponentielle (Badji et al., 2006) ou phase de déclin (Aouiche et al., 2012).

## Résultats et Discussions



**Figure 32.** Cinétique de l'évolution du pH et production de métabolites secondaires contre *Bacillus cereus* ATCC 14579.

## Résultats et Discussions



**Figure 33.** Cinétique de production métabolites secondaires par les souches d'Actinomycètes contre *Bacillus cereus* ATCC 14579.

## Résultats et Discussions

### 1.3.2.2 Extraction des composés actifs et choix du solvant d'extraction

L'extraction des métabolites secondaires des isolats d'*Actinomycètes* a été réalisée en se basant sur les résultats obtenus à partir de la cinétique de croissance et les résultats obtenus lors du criblage primaire (choix du milieu). La cinétique de production a été réalisée sur le milieu ISP2 liquide sélectionné lors du criblage primaire comme le meilleur milieu de production de métabolites secondaires et la culture a été stoppée après cinq jours d'incubation sous agitation (cette durée correspondant au jour optimal de production de métabolites secondaires déterminée lors des cinétiques).

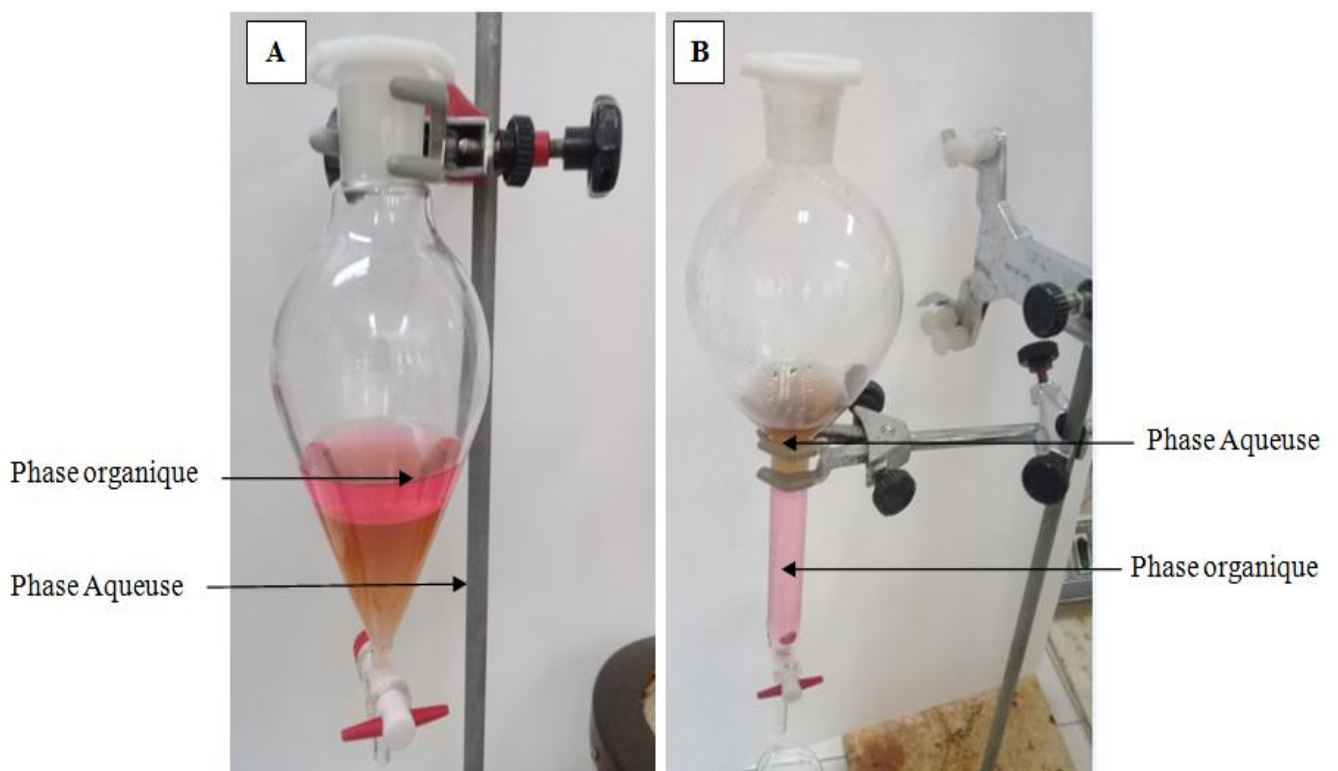
Les Tableaux 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 et 19 et les Figures 27, 28, 29 et 30, montrent les activités antimicrobiennes extractibles avec les quatre solvants différents de polarité croissante et non miscibles avec l'eau (n-hexane, dichlorométhane, acétate d'éthyle et le n-butanol). L'optimisation du meilleur solvant pour extraire les principaux métabolites bioactifs dans cette étude a révélé que le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle étaient les meilleurs pour extraire le principal agent antimicrobien. Dans une autre étude qui a utilisé différents solvants organiques dont l'hexane, le chloroforme, le dichlorométhane et l'acétate d'éthyle pour extraire les principaux composés bioactifs avec la comparaison des zones d'inhibition des extraits organiques, cette étude a montré que l'extrait dichlorométhanique était le meilleur parmi les autres solvants testés, suivi de l'acétate d'éthyle (Sebak et al., 2021).

C'est dans l'extrait d'acétate d'éthyle et l'extrait dichlorométhanique (**Figure 34**) que les activités antimicrobiennes des tous les isolats sont les plus importantes. Des activités faibles ont été enregistrées dans les autres solvants organiques (Hexane et n-butanol). Les plus grandes zones d'inhibition ont été observées dans la phase organique pour tous les isolats. Ceci démontre que les métabolites secondaires actifs produits par ces isolats étaient hydrophobes et plus extractibles par les phases polaires (acétate d'éthyle) et moyennement polaires (dichlorométhane). Pour tous les isolats, aucune activité antimicrobienne n'a été observée dans la phase aqueuse. Ceci montre que les métabolites secondaires sécrétés par ces isolats sont hydrophobes et extractibles avec des solvants organiques.

Dans l'extrait d'acétate d'éthyle et dichlorométhanique, la plupart des microorganismes testés sont tous sensibles à l'effet des molécules produites par tous les isolats. Concernant les activités anti-candidose et antibactérienne, l'extrait d'acétate d'éthyle de l'isolat SCJ a montré des zones d'inhibition significativement importantes par rapport au contrôle positif et aux

## Résultats et Discussions

autres extraits, Cela pourrait être dû à la plus grande solubilité des métabolites secondaires dans le solvant d'acétate d'éthyle (Sah and Lekhak, 2017). Par contre, l'extrait dichlorométhanique des isolats E23-2, E23-4, E23-8, E25-2, E25-9, E25-11 et E25-12 a montré une différence non significative avec le contrôle positif (cycloheximide) et une différence significative avec les autres extraits. Pour les autres isolats (E23-9, E23-10, E23-11 et E24-9), l'extrait dichlorométhanique a montré une différence significative avec le cycloheximide et les autres extraits. Les meilleures activités antimicrobiennes sont apparues avec l'extrait dichlorométhanique, suggérant que les composés bioactifs responsables de cette activité sont volatils, ce qui nous oriente vers leur caractérisation par la technique de chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).



**Figure 34.** Extraction du surnageant de l'isolat SCJ par l'acétate d'éthyle (A), et par dichlorométhane (B).

## **Chapitre II**

# **Caractérisation taxonomique des isolats d'*Actinomycètes* sélectionnées**

## Résultats et Discussions

L'objectif de ce chapitre est l'identification des isolats d'*Actinomycètes* sélectionnés par des observations morphologiques, micro-morphologiques, physiologiques, biochimiques et par des techniques moléculaires. Il est aussi important de signaler que cette étape d'identification va nous permettre de sélectionner les souches d'*Actinomycètes* non pathogènes.

### 1 Caractéristiques taxonomiques des souches d'*Actinomycètes* actives

Parmi les 18 isolats bioactifs, 12 ont montré une forte activité antimicrobienne lors du criblage secondaire. Vu l'importance des activités biologiques de ces douze souches, nous nous sommes proposés d'approfondir leur identification. Généralement deux critères sont utilisés pour l'identification des microorganismes, les critères classiques englobant les critères morphologiques, biochimiques et physiologiques et les critères moléculaires concernant l'analyse de la séquence des gènes codant pour l'ARN 16S.

#### 1.1 Etude morphologique des souches d'*Actinomycètes*

##### 1.1.1 Caractéristiques culturelles

Les caractéristiques culturelles et phénotypiques des 12 isolats d'*Actinomycètes* à savoir l'importance de la croissance, l'aspect des colonies, la présence ou l'absence du mycélium aérien et mycélium du substrat, la couleur des colonies et la production des pigments diffusibles sur la gélose ont été examinées conformément aux recommandations du projet international *Streptomyces* (ISP) (SHIRLING, 1966). Les résultats sont représentés dans le **Tableau 21 et la Figure 35**.

Les résultats des caractéristiques culturelles montrent que les 12 isolats d'*Actinomycètes* capables de se croître sur tous les milieux de culture gélosés testés (ISP1, ISP2, ISP4, ISP5 et GYEA) avec différents degrés de croissance allant d'une croissance moyenne à une croissance abondante.

Les colonies présentent des aspects circulaires, punctiformes ou étoilés selon les milieux de culture utilisés et selon de chaque isolat.

Les mycéliums aériens (surface du milieu) et les mycéliums du substrat (revers du milieu) présentent une variété de couleurs selon les milieux de cultures utilisés et selon chaque isolat (jaunâtre, blanchâtre, Marron, violet, rosâtre et orangé).

Le mycélium aérien de l'isolat SCJ est de couleur blanc poudreux sur tous les milieux ISP, tandis que le mycélium du substrat présente différentes couleurs (jaunâtre, brun et violet).

## Résultats et Discussions

Les isolats E23-2, E23-10 et E25-12 présentent une couleur blanchâtre du mycélium aérien sur tous les milieux ISP. Le mycélium du substrat est de couleur jaunâtre sur tous les milieux, à l'exception du milieu ISP2, qui a une couleur jaune orangé.

L'isolat E23-3 montre une couleur blanche du mycélium aérien sur tous les milieux ISP, tandis que le mycélium du substrat présente différentes couleurs (blanc, jaunâtre et jaune-orange).

L'isolat E23-4 est capable de former des mycéliums aériens et des mycéliums de substrat de diverses couleurs (blanc, brique et violet).

Concernant les isolats E23-8, E23-11 et E25-9, la couleur du mycélium aérien et du mycélium de substrat varie entre le blanc et le jaune dans tous les milieux ISP utilisés. Sur ISP4, le mycélium de substrat pour l'isolat E23-8 est de couleur jaune orangé. Le mycélium aérien est de couleur beige sur milieu ISP2 pour les deux isolats E23-11 et E25-9.

L'isolat E23-9 présente une couleur orangée du mycélium aérien et du substrat sur tous les milieux ISP utilisés.

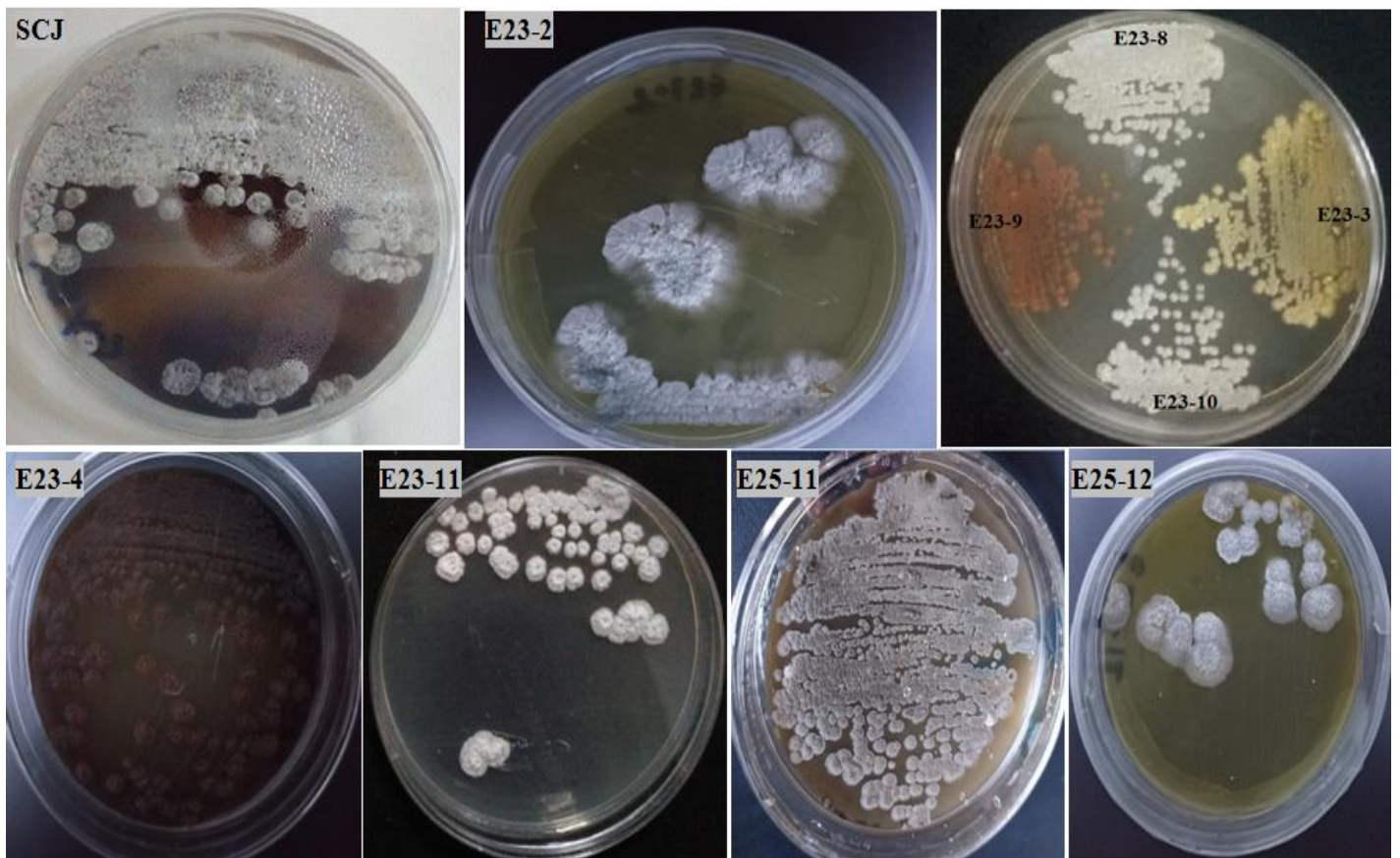
Le mycélium aérien de l'isolat E24-9 est de couleur rosâtre sur les milieux ISP1, ISP2 et GYEA alors qu'il est blanc sur les autres milieux utilisés (ISP4 et ISP5). Le mycélium de substrat est orange sur ISP2, jaunâtre sur ISP4 alors qu'il est rosâtre pour tous les autres milieux.

La couleur du mycélium aérien et du substrat de l'isolat E25-11 varie du blanc au jaune orangé dans presque tous les milieux PSI utilisés. Sur ISP2, le mycélium aérien est de couleur beige.

L'ensemble de ces différentes caractéristiques culturelles montrent que les douze isolats d'*Actinomycètes* sont différents. En particulier, ils présentent des différences dans la coloration de leurs mycéliums.



## Résultats et Discussions



**Figure 35.** Aspect morphologique des colonies des isolats de *Streptomyces* actifs

## Résultats et Discussions

**Tableau 21.** Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats actifs de *Streptomyces* sur milieux ISP solides.

Souches d' <i>Actinomycètes</i> Isolées	Milieux de cultures	Caractères culturaux				
		Croissance	Aspect des colonies	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigment diffusible
<b>SCJ</b>	ISP1	+++	Circulaire	Blanc, poudreux, non étoilé	Jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	Circulaire, irrégulière	Blanc, poudreux	Marron	Brune
	ISP4	+++	Circulaire	Blanc, poudreux	Violet	Violette
	ISP5	+++	Punctiforme	Blanc, poudreux	Jaunâtre pâle	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	Blanc, étoilé	Marron-violet	Violette
<b>E23-2</b>	ISP1	+++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	Circulaire	Blanc non poudreux et verdâtre	Jaune orangé	Absence
	ISP4	+++	Punctiforme	Blanc poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP5	+++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaune pâle	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaune pâle	Absence
<b>E23-3</b>	ISP1	+++	Punctiforme	blanc non poudreux	Blanchâtre	Absence
	ISP2	++	Etoilé	blanc non poudreux	Jaune	Absence
	ISP4	+++	Circulaire	blanc non poudreux	Jaune orange	Absence
	ISP5	+++	Circulaire	blanchâtre poudreux	Jaunâtre	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
<b>E23-4</b>	ISP1	++	Punctiforme	Blanc non poudreux	Blanchâtre	Absence
	ISP2	+++	Circulaire	Brique	Brique	Absence
	ISP4	+++	Punctiforme	Violet	Violet	Absence
	ISP5	+++	Punctiforme	Violet	Violet	Absence
	GYEA	+++	Punctiforme	Violet	Violet	Absence

(+++) : Abondant, (++) : Moyennement abondant.

## Résultats et Discussions

**Tableau 21(suite).** Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats actifs de *Streptomyces* sur milieux ISP solides.

Souches d' <i>Actinomycètes</i> Isolées	Milieux de cultures	Caractères culturaux				
		Croissance	Aspect des colonies	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigment diffusible
<b>E23-8</b>	ISP1	+++	Punctiforme	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	Circulaire	Blanc poudreux	Jaune pâle	Absence
	ISP4	+++	Punctiforme	Blanc poudreux	Jaune orangé	Absence
	ISP5	+++	Punctiforme	blanc	jaunâtre	Absence
	GYEA	+++	Punctiforme	Blanc poudreux	Jaune pâle	Absence
<b>E23-9</b>	ISP1	++	Circulaire	Orangé	Orangé	Absence
	ISP2	+++	Circulaire étoilé	Orangé	Orangé	Absence
	ISP4	++	Circulaire	Orangé	Orangé	Absence
	ISP5	++	Circulaire	Orangé	Orangé	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	Orangé	Orangé	Absence
<b>E23-10</b>	ISP1	+++	Punctiforme	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	Punctiforme	Blanc non poudreux	Jaune orangé	Absence
	ISP4	+++	Circulaire	Blanc poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP5	+++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
<b>E23-11</b>	ISP1	++	Circulaire	Blanc cassé	Jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	Circulaire, étoilé	Beige	Jaune pâle	Absence
	ISP4	++	Circulaire	Blanc cassé non poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP5	++	Circulaire	Blanc non podreux	Jaune pâle	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	Blanc cassé	Jaune pâle	Absence

(+++): Abondant, (++) : Moyennement abondant.

## Résultats et Discussions

**Tableau 21(suite).** Caractéristiques morphologiques et culturales des isolats actifs de *Streptomyces* sur milieux ISP solides.

Souches d' <i>Actinomycètes</i> Isolées	Milieux de cultures	Caractères culturaux				
		Croissance	Aspect des colonies	Mycélium aérien	Mycélium du substrat	Pigment diffusible
<b>E24-9</b>	ISP1	+++	Punctiforme	Rosâtre	Rosâtre	Absence
	ISP2	+++	Circulaire	Rosâtre	Orangé	Absence
	ISP4	+++	Circulaire	Blanc poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP5	+++	Punctiforme	Blanc poudreux	Rosâtre	Absence
	GYEA	+++	Circulaire	Rosâtre	Rosâtre	Absence
<b>E25-9</b>	ISP1	++	Circulaire	Blanc non poudreux	jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	étoilé	Beige	Jaune pâle	Absence
	ISP4	++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP5	+++	Circulaire	Blanc	Jaune pale	Absence
	GYEA	++	Circulaire	Blanc	Jaune pale	Absence
<b>E25-11</b>	ISP1	++	Circulaire étoilé	Blanchâtre non poudreux	Jaune orangé	Absence
	ISP2	++	Etoilé	Beige	Jaune orangé	Absence
	ISP4	++	Circulaire étoilé	Blanchâtre non poudreux	Jaune orangé	Absence
	ISP5	++	Circulaire étoilé	Blanchâtre non poudreux	Jaune orangé	Absence
	GYEA	+++	Circulaire étoilé	Blanchâtre non poudreux	Jaune orangé	Absence
<b>E25-12</b>	ISP1	+++	Circulaire	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence
	ISP2	+++	Punctiforme	Blanc poudreux	Jaune orangé	Absence
	ISP4	+++	Punctiforme	Blanc non poudreux	Jaune pâle	Absence
	ISP5	+++	Punctiforme	Blanchâtre	Jaunâtre	Absence
	GYEA	+++	Punctiforme	Blanc non poudreux	Jaunâtre	Absence

(+++) : Abondant, (++) : Moyennement abondant.

## Résultats et Discussions

### 1.1.2 Caractères micro-morphologiques

Après la croissance des douze isolats d'*Actinomycètes* pendant dix jours sur le milieu ISP1, les lamelles sont observées au microscope optique à l'état frais (Grossissement = x 400), et après coloration de Gram (Grossissement = X1000). Les résultats sont présentés sur les **Figures 36, 37 et 38**. La microscopie optique a révélé que tous les isolés sont des bactéries filamenteuses à Gram positif présentant des formes similaires aux *Actinomycètes*.

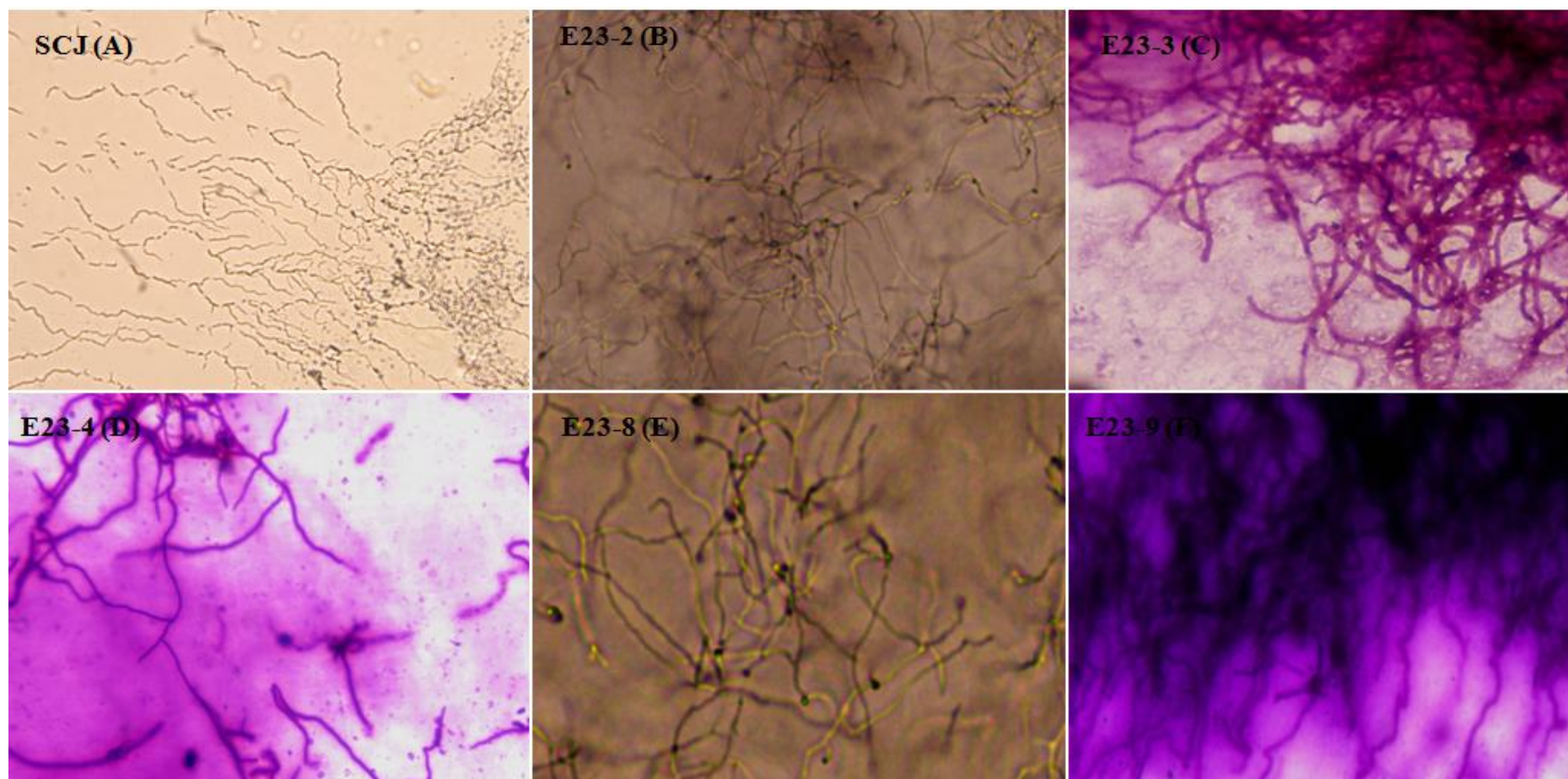
Tous les isolats SCJ, E23-2, E23-3, E23-4, E23-8, E23-9, E23-10, E23-11, E24-9, E25-9, E25-11 et E5-12 sont constitués d'un mycélium de substrat dense et épais. Ils sont également constitués de filaments à Gram positif ramifiés non fragmentés (**Figure 36 et 37**).

Concernant la morphologie des hyphes des isolats, SCJ, E23-3, E23-4, E23-11 et E25-12 ont des hyphes de type dispersés (Freely dispersed) et de type agrégat (aggregate) pour les autres isolats.

La caractérisation des espèces d'*Actinomycètes* est largement basée sur l'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des souches d'*Actinomycètes*. Selon Shirling, (1966), l'identification des *Actinomycètes* est principalement basée sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Selon Williams et al., (1993), certains genres d'*Actinomycètes* telles que *Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*, ... peuvent être identifiées des autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*, ...) avec une simple observation microscopique.

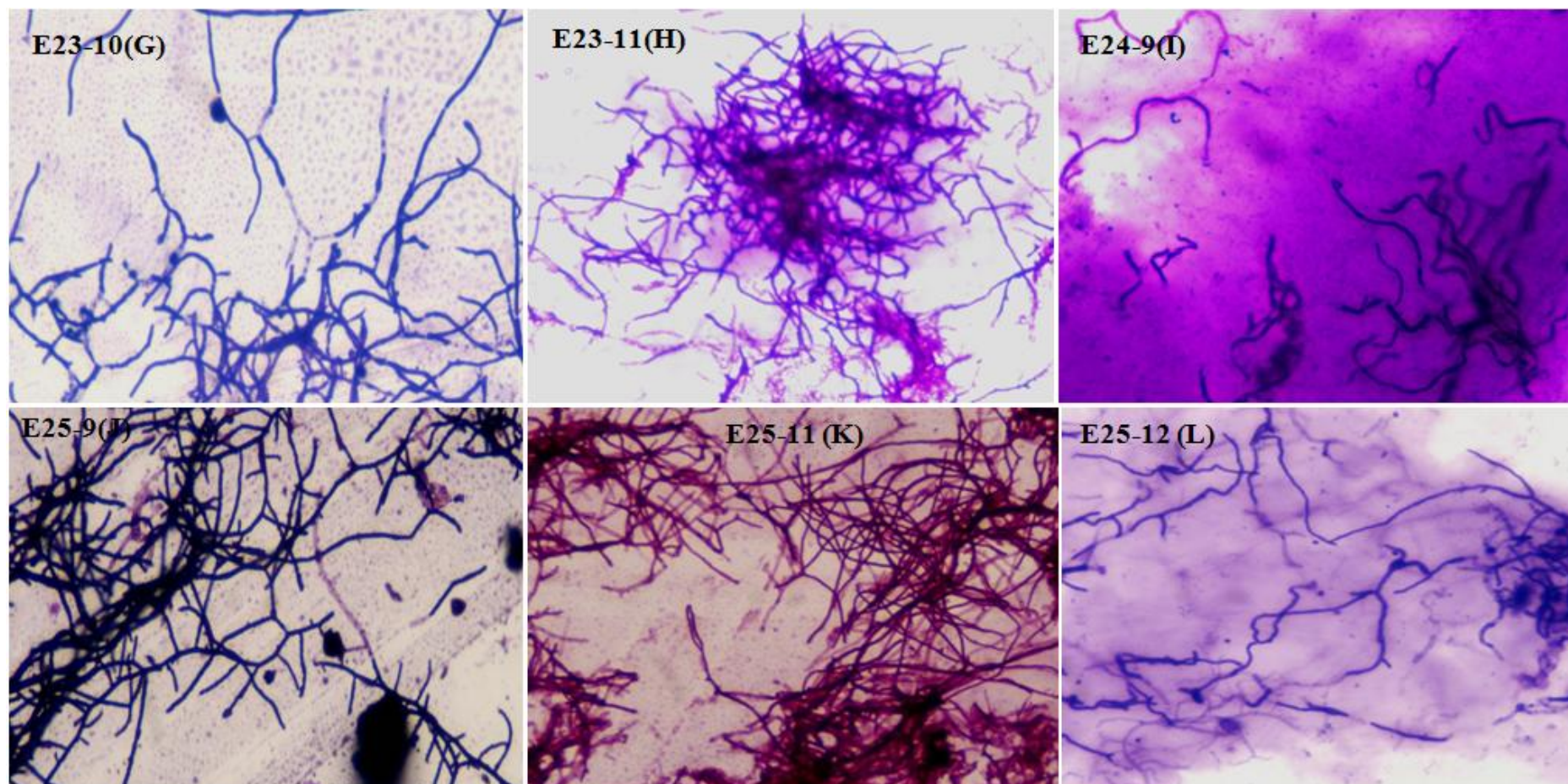
Sur la base de la recherche morphologique (caractères culturels et observation microscopique), tous les isolats présentent les traits typiques des *Streptomyces*, permettant de conclure qu'ils appartiennent à ce groupe. Ce résultat est en accord avec les travaux réalisés par Ningthouja et al., (2009). En fait, selon Thakur et al., (2007), les souches qui se développent dans une large gamme de milieux de culture présentent généralement une morphologie typique de *Streptomyces*.

## Résultats et Discussions



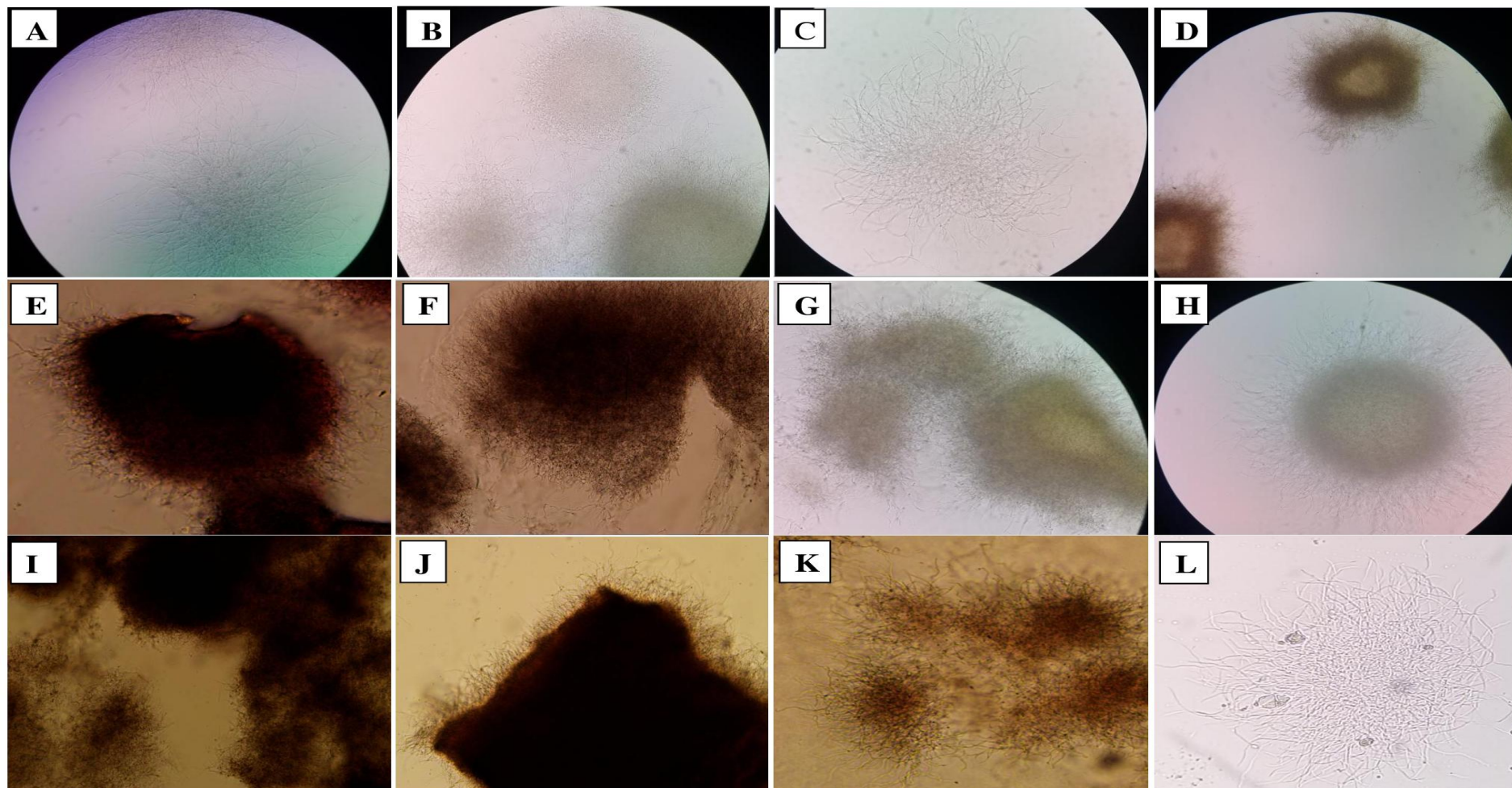
**Figure 36.** Observation en microscope optique (X40, et X100) des isolats d'*Actinomycètes* après une incubation de 14 jours à 28°C sur milieu ISP2.

## Résultats et Discussions



**Figure 37.** Observation en microscope optique (X40, et X100) des isolats d'*Actinomycètes* après une incubation de 14 jours à 28°C sur milieu ISP2.

## Résultats et Discussions



**Figure 38.** Aspect des colonies des isolats d'*Actinomycètes* après dix jours de développement sur le milieu ISP1 (Vues au microscope optique, Grossissement = X400). (A) SCJ. (B) E23-2. (C) E23-3. (D) E23-4. (E) E23-8. (F) E23-9. (G) E23-10. (H) E23-11. (I) E24-9. (J) E25-9. (K) E25-11. (L) E25-12.



## Résultats et Discussions

### 1.2 Caractéristiques physiologiques, biochimiques et production des pigments mélanoïdes des isolats d'*Actinomycètes* actifs

Les caractéristiques physiologiques, biochimiques et production de pigments mélanoïdes des douze isolats d'*Actinomycètes* sont illustrées dans le **Tableau 22** et la **Figure 39**. Ces résultats sont très importants pour la classification des isolats et seront également utiles pour optimiser les conditions de culture afin d'améliorer la production des composés secondaires produits par ces isolats.

#### 1.2.1 Production de pigments mélanoïdes

Aucun pigment diffusible sur les milieux de culture n'a été observé pour tous les isolats, à l'exception celui de SCJ, qui a produit un pigment violet-brun sur les milieux ISP2, ISP4, ISP5 et GYEA (**Figure 39**). En effet, ces pigments sont les produits de la transformation de la tyrosine en DOPA-mélanine, responsable de la couleur (Vinarov et al., 2002).

La production de ces pigments mélanoïdes est une caractéristique très importante pour la classification des *Streptomyces* (Shirling, 1966). Selon Dastager et al., (2006) , certains *Actinomycètes* peuvent produire des substances brun foncé dans les milieux de culture, communément appelées pigments mélanoïdes. Vinarov et al., (2002) considéraient que les composés de ce pigment mélanoïde sont des polymères irréguliers, de couleur brun foncé, formés par de nombreux micro-organismes via une oxydation fermentaire.

En outre, les pigments mélanoïdes ont un large spectre d'activités biologiques, avec des fonctions radio-protectrices (Dadachova et al., 2007) , antioxydantes (De Goncalves and Pombeiro-Sponchiado, 2005), antimicrobiennes (Casadevall et al., 2000) et anti-tumorales (El-Obeid et al., 2006).

#### 1.2.2 Croissance à différentes valeurs de pH et de température

Les 12 isolats d'*Actinomycètes* se développent dans une gamme de pH de 5,33 à 10,03, avec une croissance optimale à 8,28 pH, et sont incapables de se développer à un pH inférieur à 5 (**Tableau 22**). Ainsi, nous avons constaté que les douze isolats d'*Actinomycètes* testés préféraient se développer dans des conditions de pH neutre ou légèrement alcalin.

La plupart des espèces d'*Actinomycètes* sont mésophiles avec des températures de croissance optimales entre 25 et 30°C (Barka et al., 2016a). La croissance optimale enregistrée pour les douze isolats se situe entre 28 et 37°C. Aucune des souches d'*Actinomycètes* testées n'a pu se

## Résultats et Discussions

développer à 4°C et 46°C. Ces résultats concordent bien avec ceux obtenus par Singh et al., (2012).

### 1.2.3 Tolérance au chlorure de Sodium (Na Cl)

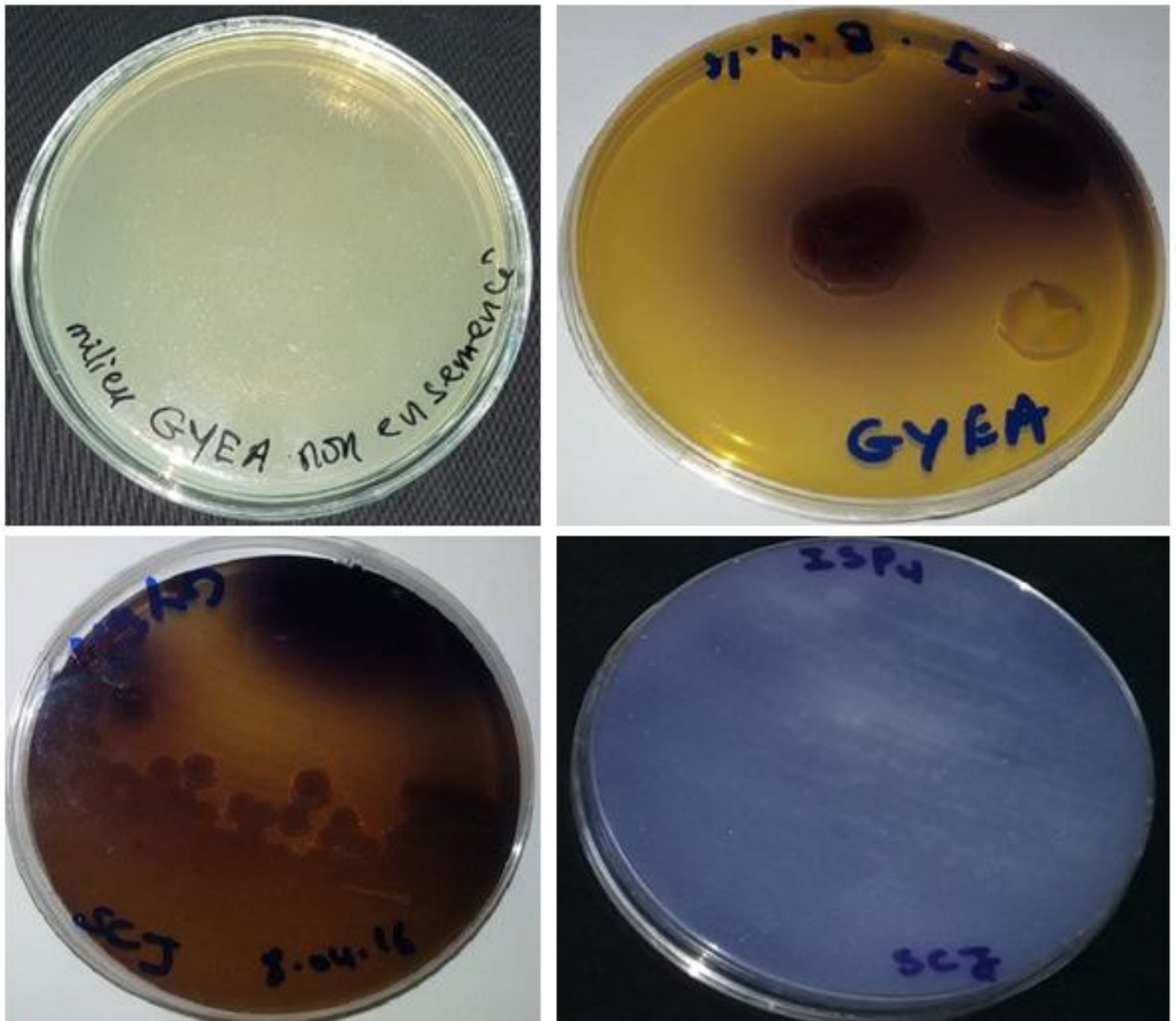
Les douze isolats d'*Actinomycètes* tolèrent des concentrations en NaCl de 1 à 5 %, par contre aucune croissance au-delà de 7 %. A partir de ces résultats, nous avons remarqué que certains isolats d'*Actinomycètes* (E23-2, E23-3, E23-8, E23-10, E23-11 et E25-12) avaient la capacité de résister à des concentrations en NaCl allant jusqu'à 70 g/L (7 %). Les auteurs, Tian et al., (2014) ont conclu que les environnements salins ou hyper-salins doivent faire l'objet d'une attention particulière car ils pourraient offrir de nouvelles voies pour la découverte de nouvelles molécules naturelles et industriellement utiles.

### 1.2.4 Assimilation de la source de carbone

Le test de la mise en évidence de la source de carbone (**Tableau 22**) a montré que la majorité des isolats d'*Actinomycètes* sont capables d'assimiler les différents composés glucidiques comme source de carbone. En effet, les isolats SCJ, E23-2, E23-8, E23-10 et E23-11 ont la capacité d'assimiler et d'utiliser tous les substrats carbonés sauf le ribose. Les isolats E23-4, E23-8, E23-10, E25-9 et E25-12 ont également la capacité d'utiliser tous les substrats carbonés sauf le mélézitose. L'isolat E23-9 est incapable d'utiliser les substrats carbonés suivants : ribose, mélézitose, mannitol et mélibiose. De même, l'isolat E24-9 ne peut pas utiliser les substrats : mélézitose, mannitol, raffinose et mélibiose, comme source de carbone. L'isolat E25-11 a utilisé tous les glucides à l'exception de ribose, melezitose et sucrose.

L'assimilation du carbone par les souches d'*Actinomycètes* constitue une étape majeure de l'identification. Pandey et al., (2005) ont montré que pour la production optimale d'antibiotiques, certaines sources de carbone sont nécessaires.

## Résultats et Discussions



**Figure 39.** Production de pigments brun-violet par l'isolat SCJ sur milieux de cultures GYEA et ISP2.

## Résultats et Discussions

**Tableau 22.** Caractéristiques biochimiques et physiologiques des isolats d'*Actinomycètes*.

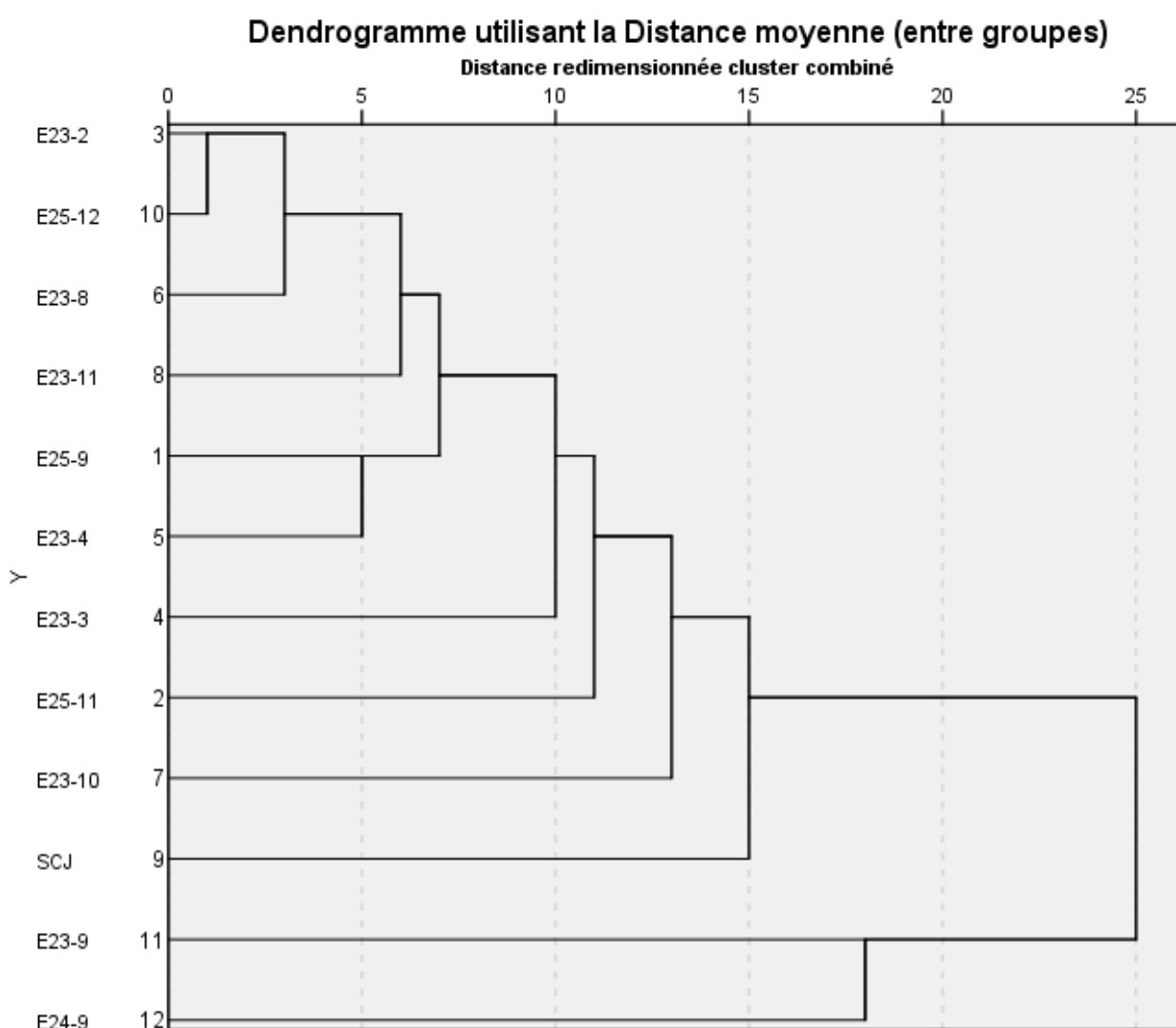
Caractéristiques	SCJ	E23-2	E23-3	E23-4	E23-8	E23-9	E23-10	E23-11	E24-9	E25-9	E25-11	E25-12
<b>Assimilation</b>												
<b>Ribose</b>	-	-	+	+	-	-	-	-	2+	+	-	+
<b>Melezitose</b>	+	+	3+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
<b>Manitol</b>	3+	3+	3+	3+	3+	-	2+	3+	-	3+	3+	3+
<b>Trehalose</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>Cellobiose</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>Sucrose</b>	+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	-	3+
<b>Raffinose</b>	+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	-	3+	3+	3+
<b>Xylose</b>	+	3+	3+	+	3+	+	3+	2+	3+	3+	3+	3+
<b>Melibiose</b>	3+	3+	3+	3+	3+	-	+	3+	-	3+	3+	3+
<b>Mannose</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>Fructose</b>	+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	3+	+	3+	3+	3+
<b>Galactose</b>	+	3+	3+	3+	+	3+	3+	3+	+	3+	3+	3+
<b>Maltose</b>	3+	3+	2+	2+	2+	2+	+	3+	3+	2+	3+	3+
<b>Glucose</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>Tolérance pH</b>												
<b>4,63</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>5,33</b>	2+	2+	+	+	+	+	2+	+	+	+	2+	+
<b>6,41</b>	2+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	2+	+	2+	3+	2+
<b>7,31</b>	2+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	2+	3+	3+	3+
<b>8,28</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>9,27</b>	2+	3+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+
<b>10,03</b>	2+	2+	2+	+	3+	+	2+	3+	3+	+	2+	3+
<b>Tolérance NaCl</b>												
<b>1 %</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>2 %</b>	3+	3+	3+	3+	3+	2+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>3 %</b>	3+	3+	3+	2+	3+	+	3+	3+	2+	3+	3+	3+
<b>4 %</b>	3+	3+	3+	2+	2+	+	3+	2+	+	3+	3+	2+
<b>5 %</b>	2+	2+	3+	+	+	+	2+	2+	+	2+	3+	2+
<b>7 %</b>	-	2+	+	-	+	-	3+	+	-	-	-	+
<b>10 %</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>Croissance sur</b>												
<b>4°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<b>28°C</b>	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+	3+
<b>37°C</b>	+	3+	3+	+	2+	2+	2+	2+	3+	+	3+	2+
<b>46°C</b>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : Absence de croissance ; (+) : Faible croissance ; (2+) : Croissance moyenne ; (3+) : Bonne croissance.

## Résultats et Discussions

### 1.3 Analyse hiérarchique en clusters

Les 12 isolats d'*Actinomycètes* qui ont montré une forte activité antimicrobienne lors du criblage secondaire ont été soumis à une analyse hiérarchique en clusters basée sur 64 caractères macroscopiques, microscopiques, biochimiques et physiologiques. Un dendrogramme basé sur la relation moyenne entre les groupes a été créé à l'aide du logiciel SPSS version 23 (IBM SPSS statistics 23). Le dendrogramme a divisé les isolats d'*Actinomycètes* actifs en deux groupes principaux (**Figure 40**). Le premier groupe (cluster) comprend dix isolats (E23-2, E25-12, E23-10, E23-11, E23-8, E25-9, E23-3, E23-9, E2511 et SCJ), tandis que les isolats E23-4 et E24-9 forment le douzième groupe (cluster).



**Figure 40.** Dendrogramme montrant la relation évolutive des isolats d'*Actinomycètes*.

## Résultats et Discussions

### 1.4 Identification moléculaire et analyse phylogénétique des isolats d'*Actinomycètes* bioactifs

Cependant, malgré toutes les informations obtenues à partir des résultats des caractères morphologiques, micro-morphologiques, physiologiques et biochimiques, seules des études phylogénétiques basées sur le séquençage du gène codant pour l'ARNr 16S nous permettront de déterminer définitivement l'appartenance de nos 12 isolats à des genres spécifiques et leur ressemblance avec les espèces existantes. Ce travail sera présenté dans la section suivante.

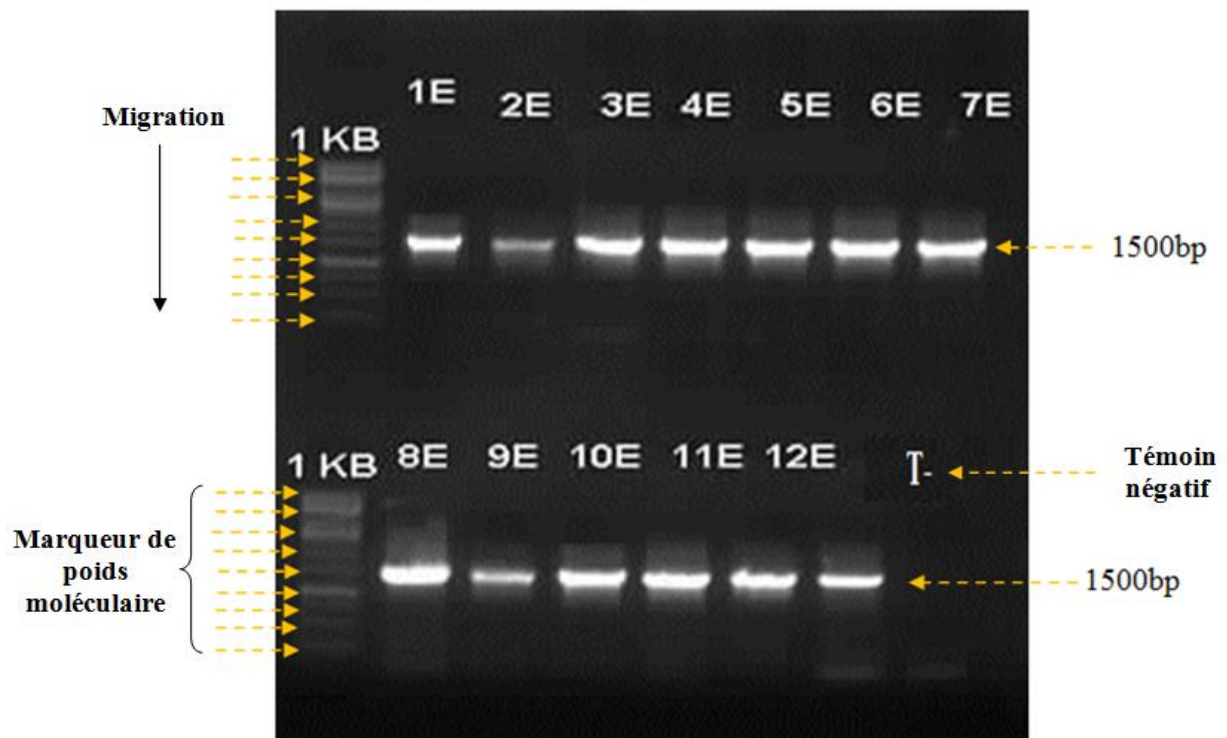
Les 12 isolats d'*Actinomycètes* actifs ont été sélectionnés pour une caractérisation plus poussée en utilisant l'étude de la séquence homologique de l'ARN ribosomal 16S. Ces 12 isolats d'*Actinomycètes* ont fait l'objet de l'extraction et le séquençage du gène de leur ARN 16S afin de déterminer leurs positions phylogénétiques. L'ADN extrait de chaque isolat a été quantifié à l'aide d'un spectrophotomètre NanoDrop 8000 (thermo scientific) en calculant les rapports 260 / 280 et 260 / 230 (**Figure 41**).



**Figure 41.** Dosage de l'ADN extrait par Nanodrop 8000. Les concentrations des 12 échantillons sont présentées dans la **Figure** ci-dessous.

## Résultats et Discussions

L'analyse électrophorétique des produits de PCR a révélé l'amplification d'un seul fragment d'ADN avec une taille attendue d'environ 1500 paires de base (pb) (**Figure 42**).



**Figure 42.** Electrophorèse sur gel d'agarose pour l'amplification des gènes codant pour l'ARNr 16S des souches d'*Actinomycètes*. Les bandes ont été fractionnées par électrophorèse sur un gel d'agarose (1 %) et visualisées par le système de documentation photographique " G Box ". **1E** (SCJ), **2E** (E23-2), **3E** (E23-3), **4E** (E23-4), **5E** (E23-8), **6E** (E23-9), **7E** (E23-10), **8E** (E23-11), **9E** (E24-9), **10E** (E25-9), **11E** (E25-11), **12E** (E25-12).

Après le séquençage réalisé au centre national de la recherche scientifique et technique (CNRST), les séquences nucléotidiques obtenues ont été assemblées puis alignées à l'aide d'un logiciel MEGA-X version 10.2.5 (Kumar et al., 2018) (**Figure 43**).

Les séquences des isolats sélectionnés SCJ, E23-2, E23-3, E23-4, E23-8, E23-9, E23-10, E23-11, E24-9, E25-9, E25-11 et E25-12 ont été déposées dans GenBank du Centre national pour les informations biotechnologiques (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) sous les numéros d'accès suivants : OP101646, OM883988, OM883989, OM883990, OM883991, OM883992, OM883993, OM883994, OM883995, OM883996, OM883997 et OM883998.

## Résultats et Discussions

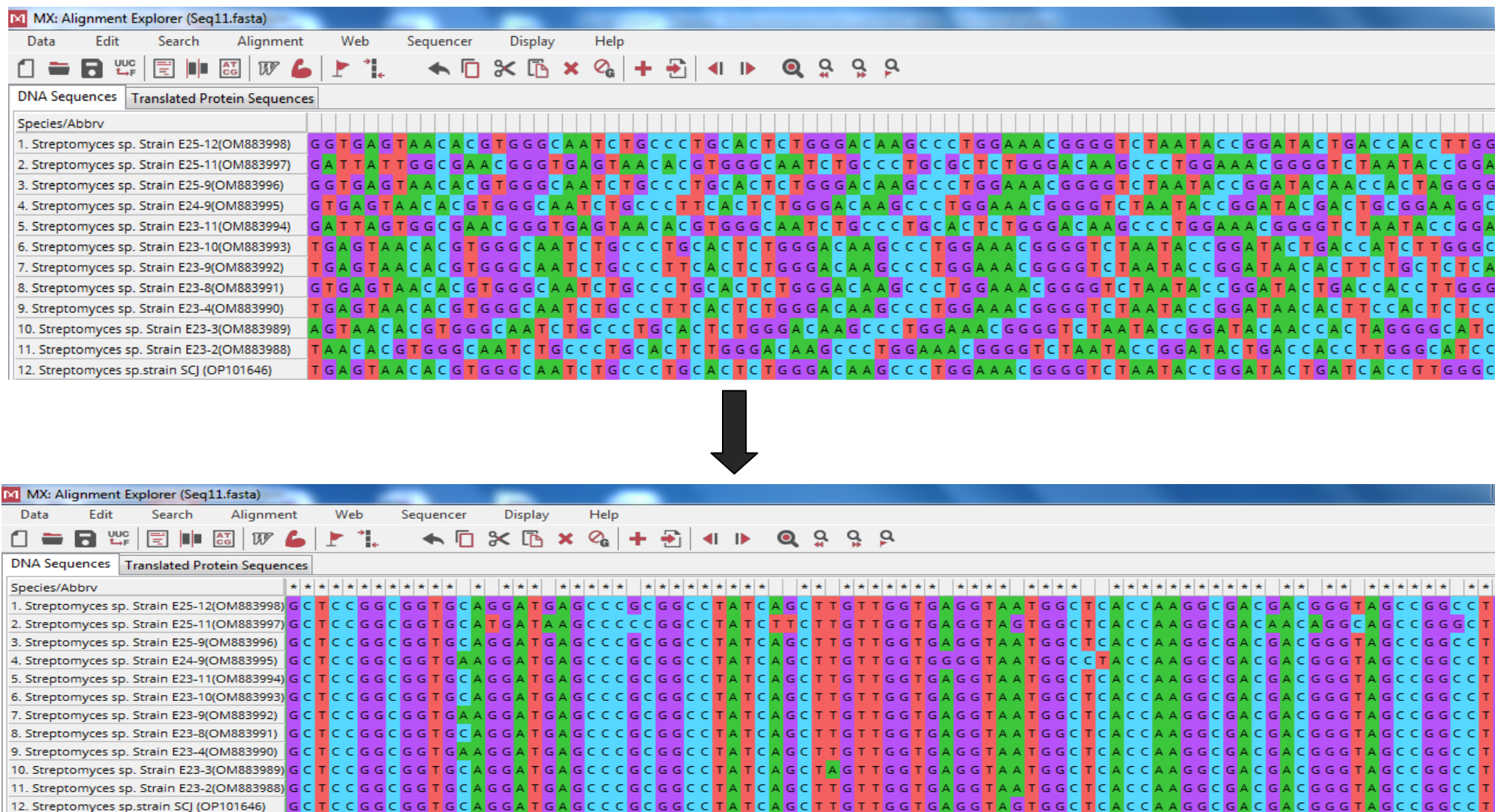


Figure 43. Alignement des 12 séquences nucléotidiques par la méthode Muscle à l'aide d'un logiciel MEGA-X version 10.2.5.



## Résultats et Discussions

La comparaison des séquences alignées obtenues avec celles disponibles au niveau de la base de donnée génomique GenBank, nous a permis de désigner le statut taxonomique pour chaque isolats d'*Actinomycètes*. Les résultats indiquent que tous les isolats testés appartiennent au genre *Streptomyces* (100 %) (**Figure 44**). 6 isolats ont été identifiés jusqu'au niveau de l'espèce tandis que les cinq autres isolats ont été identifiés jusqu'au niveau du genre (**Tableau 23**).

Les 6 isolats (E23-3, E23-9, E23-10, E24-9, E25-12 et SCJ) présentaient un pourcentage très élevé de similarité au niveau de l'espèce (> 99 %). L'isolat E23-3 présentait une similarité de 99,06 % avec *Streptomyces africanus* NBRC 101005T (NR\_112600.1), l'isolat E23-9 était similaire à 99,28 % à *Streptomyces galilaeus* NBRC 13400T (NR\_112389.1), E24-9 a montré une similarité de 99,63 % avec *Streptomyces amritsarensis* 2AT (NR\_126204.1), SCJ était similaire à 99,78 % à *Streptomyces coeruleofuscus* YR-42 (KY753282.1) tandis que les isolats E23-10 et E25-12 étaient tous deux étroitement similaires à la souche NBRC 12844T (NR\_041222.1) de *Streptomyces bellus*, (**Tableau 23**), mais sont différent morphologiquement. Suite à ces résultats, un arbre phylogénétique a été construit avec le même logiciel d'alignement en utilisant la méthode du « Neighbour-joiningtree ».

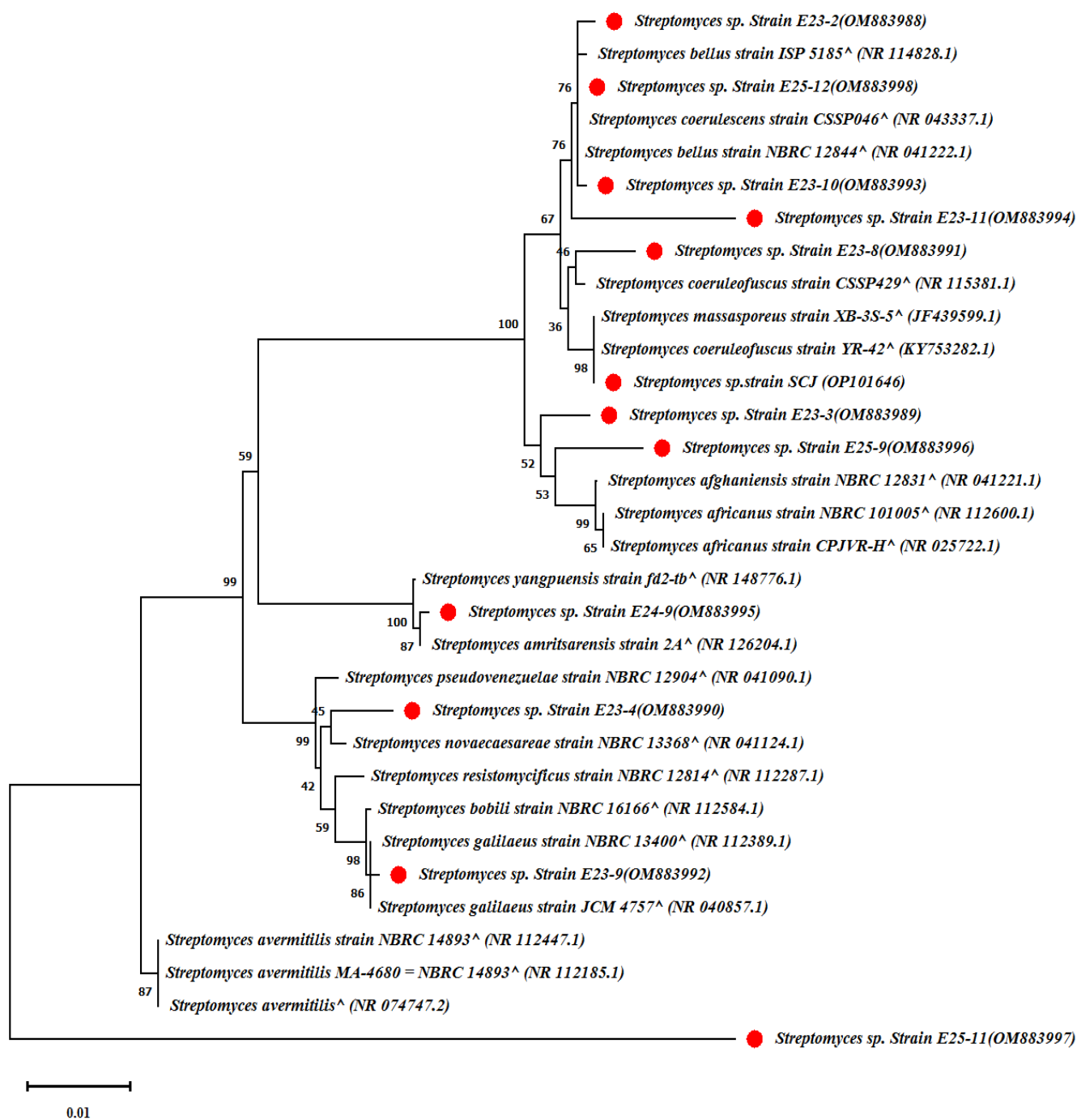
Les résultats de cet identification moléculaire qui est basée sur l'homologie de l'ARN ribosomal 16S sont en accord avec les études précédentes et confirment que le genre *Streptomyces* est prédominant dans les sols par rapport aux autres genres d'*Actinomycètes* (Kitouni et al., 2005; Williams and Vickers, 1988). En effet, Kitouni et al., (2005) ont rapporté que 93 % des souches actives d'*Actinomycètes* appartenaient au genre *Streptomyces*. Dans la présente étude, trois souches (E23-11, E25-9 et E25-11) se sont révélées similaires à moins de 98,7 % aux souches connues les plus proches, ce qui implique qu'elles pourraient être de nouveaux taxons (Rossi-Tamisier et al., 2015). Ces résultats ont été confirmés avec d'autres bases de données (EzBioCloud) et donnent les mêmes similarités avec les mêmes taxons les plus proches (90,24 % pour (E25-11), 97,25 % pour (E23-11) et 98,20 % (E25-9)).

L'analyse de l'arbre phylogénétique des souches sélectionnées a montré que la proximité ou la distance entre ces souches étaient indépendantes du profil des caractères macroscopiques, microscopiques, biochimiques et physiologiques. Par exemple, d'un point de vue phylogénétique, les souches E23-4 et E24-9 étaient assez similaires, mais lorsqu'elles ont été comparées en termes de caractéristiques macroscopiques, physiologiques et biochimiques, ainsi que d'activité antimicrobienne, une différence considérable a été constatée. Le

## **Résultats et Discussions**

dendrogramme a révélé que ces deux souches étaient distinctes. Il a été rappelé que la souche E23-4 a été isolée du site de Sebt Jahjough El Hajeb, et la seconde souche (E24-9) du site forestier d'Ain Vittel Ifrane, par conséquent, la différence d'habitat naturel (origine de l'isolement des souches) pourrait être la cause de cette indépendance. Ces résultats sont en accord avec ceux rapportés par Sengupta et al., (2015).

## Résultats et Discussions



**Figure 44.** Arbre phylogénétique basé sur les séquences du gène de l'ARNr 16S des isolats d'*Actinomycètes*.

L'arbre phylogénétique basé sur le gène de l'ARNr 16S a été établi par méthode statistique (Neighbour-Joining Tree test), montrant les relations évolutives entre les 12 isolats d'*Actinomycètes* marqués par un cercle rouge et leurs taxons connus les plus proches. Chaque branche de l'arbre est associée à une valeur bootstrap (un pourcentage allant de 0 à 100 %) qui indique le nombre de fois où elle a été retrouvée lors des répétitions et détermine ainsi sa crédibilité, seules les valeurs (> 35 %) sont affichées. La barre (0,01) représente le nombre de substitutions par position nucléotidique (1 % de divergence entre les séquences). Les numéros d'accèsion GenBank sont indiqués entre parenthèses.

## Résultats et Discussions

**Tableau 23.** Identification moléculaire des 12 isolats d'*Actinomycètes* sélectionnés basée sur le séquençage du gène de l'ARNr 16S.

Nom de l'isolat	Longueur de la requête (pb)	Espèce la plus proche connue <sup>A</sup>	Pourcentage d'identité (%)	Identification <sup>B</sup> (Nom scientifique)	NCBI GenBank numéro (s) d'accession
SCJ	1389	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i> YR-42 (T) (KY753282.1)/ <i>Streptomyces massasporeus</i> XB-3S-5 (T)(JF439599.1)	99,78	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i> / <i>Streptomyces massasporeus</i>	OP101646
E23-2	1393	<i>Streptomyces bellus</i> NBRC 12844(T)(NR_041222.1) / <i>Streptomyces coerulescens</i> CSSP046(T) (NR_043337.1)	98,92	<i>Streptomyces</i> sp.	OM883988
E23-3	1388	<i>Streptomyces africanus</i> NBRC 101005 (T) (NR_112600.1)	99,06	<i>Streptomyces africanus</i>	OM883989
E23-4	1399	<i>Streptomyces novaecaesareae</i> NBRC 13368 (T)(NR_041124.1)/ <i>Streptomyces resistomycificus</i> NBRC 12814 (T) (NR_112287.1) / <i>Streptomyces pseudovenezuelae</i> NBRC 12904 (T)(NR_041090.1)	98,65	<i>Streptomyces</i> sp.	OM883990
E23-8	1402	<i>Streptomyces coeruleofuscus</i> CSSP429 (T) (NR_115381.1) / <i>Streptomyces bellus</i> NBRC 12844 (T) (NR_041222.1)	98,15	<i>Streptomyces</i> sp.	OM883991
E23-9	1395	<i>Streptomyces galilaeus</i> NBRC 13400 (T) (NR_112389.1)/ <i>Streptomyces galilaeus</i> JCM 4757 (T) (NR_040857.1)	99,28	<i>Streptomyces galilaeus</i>	OM883992

## Résultats et Discussions

E23-10	1231	<i>Streptomyces bellus</i> NBRC 12844(T) (NR_041222.1)	99,59	<i>Streptomyces bellus</i>	OM883993
E23-11	1508	<i>Streptomyces bellus</i> NBRC 12844 (T) (NR_041222.1)/ <i>Strepto</i> <i>myces coeruleofuscus</i> CSSP429 (T) (NR_115381.1)	97,56	<i>Streptomyces</i> sp.	OM883994
E24-9	1373	<i>Streptomyces</i> <i>amritsarensis</i> 2A (T) (NR_126204.1)	99,63	<i>Streptomyces</i> <i>amritsarensis</i>	OM883995
E25-9	1416	<i>Streptomyces</i> <i>afghaniensis</i> NBRC 12831 (T) (NR_041221.1) / <i>Streptomyces</i> <i>africanus</i> NBRC 101005 (T) (NR_112600.1)	97,25	<i>Streptomyces</i> sp.	OM883996
E25-11	1576	<i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i> (T) (NR_074747.2) / <i>Streptomyces</i> <i>avermitilis</i> NBRC 14893 (T) (NR_112447.1)	91,61	<i>Streptomyces</i> sp.	OM883997
E25-12	1394	<i>Streptomyces bellus</i> NBRC 12844 (T) (NR_041222.1)	99,64	<i>Streptomyces bellus</i>	OM883998

<sup>A</sup>Le programme BLAST de nucléotides du NCBI a été utilisé pour trouver la correspondance la plus proche par rapport à la base de données de séquences d'ARN de référence non redondantes (refseqrna). Le numéro de la souche, le type de souche (T) et le numéro d'accès GenBank sont tous indiqués après le nom de l'espèce.

<sup>B</sup>Les isolats d'*Actinomycètes* présentant un pourcentage d'identité supérieur à 98,7 % et une seule concordance la plus proche pour les mêmes caractéristiques d'identité sont classés jusqu'au niveau de l'espèce.

Pour évaluer la fiabilité d'un arbre phylogénétique, le logiciel MEGA-X fournit le test Bootstrap. Ce test utilise la stratégie de ré-échantillonnage bootstrap, vous devez donc entrer le nombre de répliques. Pour un ensemble de données déterminées, les tests applicables et la méthode d'inférence de la phylogénie sont activés. Le test Neighbor joining comprend un test supplémentaire (Interior Branch), qui nécessite les mêmes données que le test bootstrap.

## **Chapitre III**

# **Mise en évidence de l'activité antioxydante et anticancéreuse des souches d'*Actinomycètes* sélectionnées**

## Résultats et Discussions

L'objectif de ce chapitre était d'évaluer l'activité antioxydante et anticancéreuse des isolats d'*Actinomycètes* qui présentent une grande activité antimicrobienne (en se basant sur les résultats du chapitre précédent).

Cette étude a été réalisée en cinq étapes. La première étape consiste à déterminer les teneurs en composés phénoliques et en flavonoïdes de 6 extraits bruts d'*Actinomycètes*. La deuxième étape est d'évaluer leurs activités antioxydantes *in vitro* par les tests de DPPH, ABTS et FRAP. La troisième étape est de réaliser une corrélation entre les teneurs en composés phénoliques, les flavonoïdes et les activités antioxydantes. La quatrième étape est de tester la cytotoxicité de 6 extraits dichlorométhaniques sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468). La dernière étape c'est d'évaluer la toxicité des 6 extraits dichlorométhaniques par test d'hémolyse *vis-à-vis* des cellules humaines normales (globules rouges (RBC)) et par spectrophotomètre UV-vis à balayage.

### 1 Propriétés antioxydantes

#### 1.1 Teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes des extraits bruts

Les résultats des teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes dans les extraits de dichlorométhane des souches de *Streptomyces* sont résumés dans le **Tableau 24**. Les résultats ont révélé une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les isolats testés dans le test du contenu en polyphénols, par contre, il n'y a pas de différence significative dans le test du contenu en flavonoïdes.

L'isolat SCJ a montré le contenu phénolique le plus élevé par rapport aux autres isolats (**Tableau 24**). En ce qui concerne les flavonoïdes, l'analyse statistique (test de Tukey) n'a montré aucune différence significative entre les isolats, néanmoins l'isolat SCJ contenait aussi la plus forte teneur en flavonoïdes par rapport aux autres isolats (**Tableau 24**).

## Résultats et Discussions

**Tableau 24.** Teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes de l'extrait dichlorométhanique de 6 isolats d'*Actinomycètes*.

Extraits dichlorométhanique	Teneur totale en phénol (mg EAG/mg extrait)	Teneur totale en flavonoïdes (mg EQ/mg extrait)
SCJ	0,88 ± 0,219 <sup>A</sup>	0,048 ± 0,016 <sup>A</sup>
E23-2	0,36 ± 0,012 <sup>E</sup>	0,028 ± 0,005 <sup>A</sup>
E23-4	0,42 ± 0,004 <sup>D</sup>	0,044 ± 0,006 <sup>A</sup>
E23-11	0,64 ± 0,008 <sup>B</sup>	0,031 ± 0,003 <sup>A</sup>
E25-11	0,49 ± 0,016 <sup>C</sup>	0,035 ± 0,002 <sup>A</sup>
E25-12	0,10 ± 0,001 <sup>F</sup>	0,032 ± 0,005 <sup>A</sup>

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 3). Dans chaque colonne, les moyennes avec les mêmes lettres ne sont pas significativement différentes, selon Ordinary one-way ANOVA : test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05.

### 1.2 Activités antioxydantes *in vitro* par DPPH, ABTS et FRAP

Parmi les 12 isolats d'*Actinomycètes*, 6 isolats ont été sélectionnés pour des études de bio-activité supplémentaire (activité antioxydante) en raison de leur large spectre de production d'antimicrobienne (souches d'*Actinomycètes* actives contre presque toutes les souches d'essai).

Une étude a montré que l'utilisation d'un seul test pourrait être insuffisant pour déterminer l'activité antioxydante des extraits (Law et al., 2019). En cette raison, les propriétés antioxydantes des extraits dichlorométhaniques de ces 6 isolats d'*Actinomycètes* étudiées ont été estimées en utilisant trois tests *in vitro* (DPPH, ABTS et FRAP) et les résultats ont été présentés dans le **Tableau 25** et les **Figures 45 et 46**. Tous les extraits dichlorométhaniques des souches d'*Actinomycètes* testés ont révélé une activité de piégeage des radicaux libres ABTS, DPPH inférieure à celle des standards (l'ABTS et acide ascorbique) (p < 0,01).

Comme indiqué dans le **Tableau 25**, l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ présente la plus forte activité anti-radical libre contre le DPPH, l'ABTS par rapport aux autres extraits dichlorométhaniques.

L'activité de piégeage des extraits contre l'ABTS a diminué dans l'ordre suivant : Souche SCJ > Souche E23-2 ≈ Souche E25-11 > Souche E23-11 ≈ Souche E25-12 > Souche E23-4 avec



## Résultats et Discussions

des pourcentages d'inhibition respectivement :  $36,83 \pm 01,43$  ( $CI_{50} = 1,35 \pm 0,018$ )  $>$   $33,81 \pm 3,12$  ( $CI_{50} = 1,42 \pm 0,082$ )  $\approx$   $32,67 \pm 0,36$  ( $CI_{50} = 1,52 \pm 0,014$ )  $>$   $29,45 \pm 2,06$  ( $CI_{50} = 1,65 \pm 0,115$ )  $\approx$   $29,31 \pm 0,71$  ( $CI_{50} = 1,69 \pm 0,034$ )  $>$   $27 \pm 0,22$  ( $CI_{50} = 1,82 \pm 0,039$ ) ( $\approx$  : indique que les valeurs ne sont pas statistiquement différentes,  $p > 0,05$ ).

En outre, l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ présente la plus grande activité de piégeage contre le radical DPPH avec un pourcentage d'inhibition de  $38,61 \pm 1,43$  ( $CI_{50} = 1,27 \pm 0,042$ ). En revanche, les autres extraits dichlorométhaniques ont montré de faibles activités dans la gamme de 19-25 % d'inhibition.

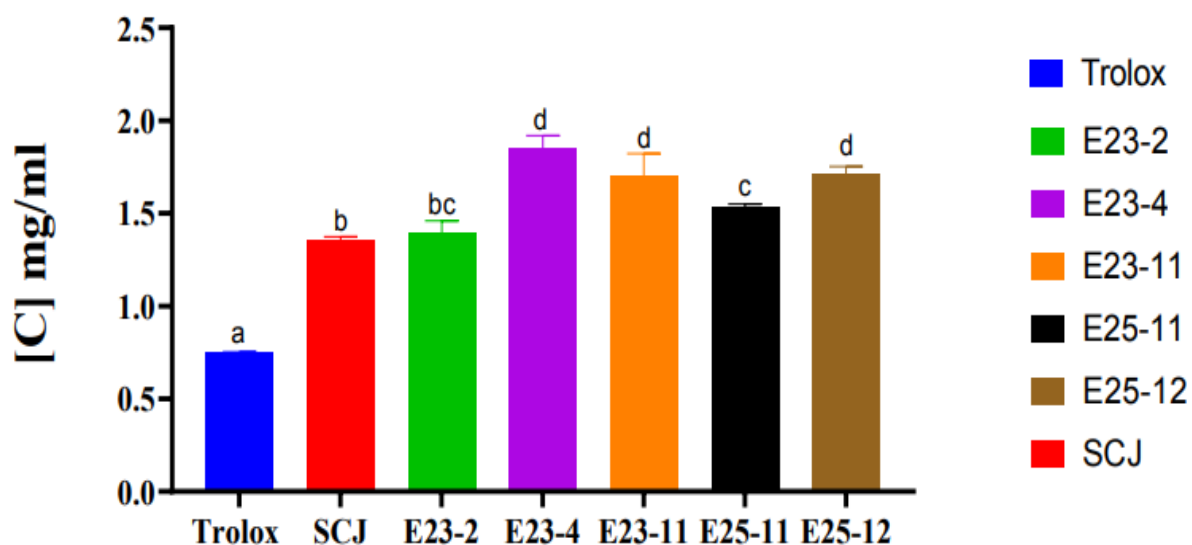
Concernant le pouvoir antioxydant réducteur de fer (FRAP) des extraits, les résultats ont révélé une différence significative ( $p < 0,05$ ) entre les isolats. En comparaison avec les autres isolats, SCJ avait le pouvoir antioxydant réducteur de fer le plus élevé ( $1,58 \pm 0,012$  mg EAA / mg extrait).

## Résultats et Discussions

**Tableau 25.** Activité antioxydante des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d'*Actinomycètes* dans différents tests antioxydants (ABTS, DPPH et FRAP).

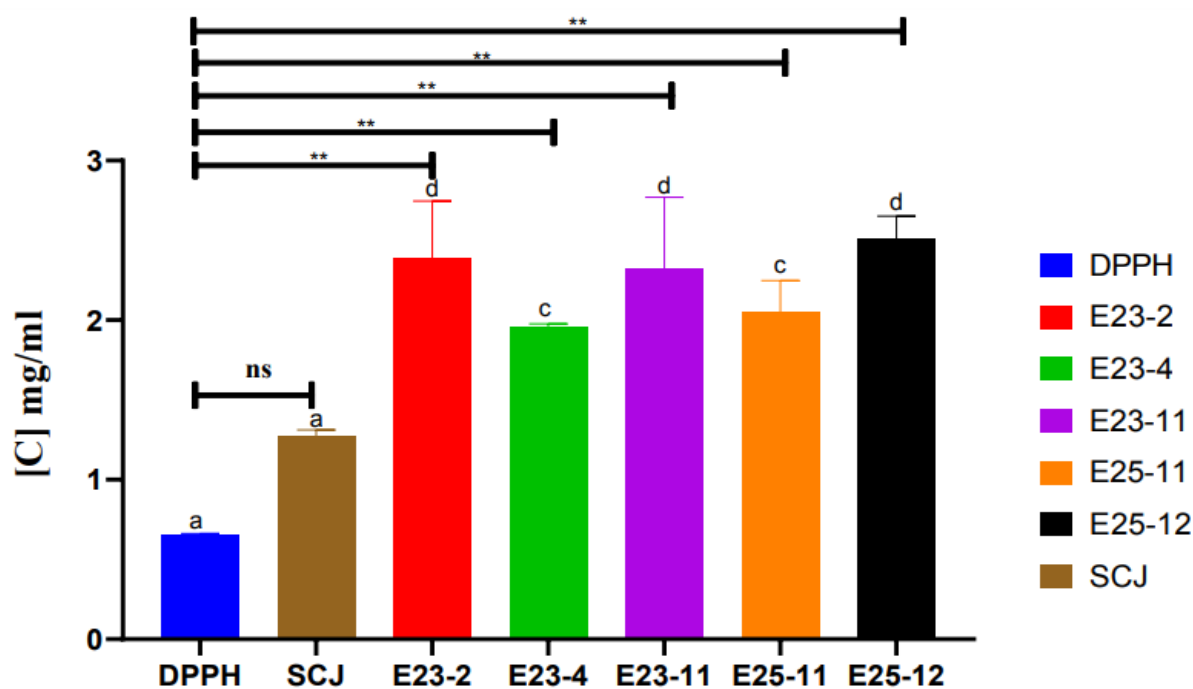
Extraits dichlorométhanique des isolats d' <i>Actinomycètes</i>	Activités antioxydantes		
	Activité de piégeage du radical ABTS (%)	Activité de piégeage du radical DPPH (%)	pouvoir antioxydant réducteur ferrique FRAP (mg EAA / mg extrait*)
SCJ	36,83 ± 01,43 <sup>B</sup>	38,61 ± 01,43 <sup>B</sup>	1,58 ± 0,012 <sup>A</sup>
E23-2	33,81 ± 3,12 <sup>C</sup>	21,17 ± 3,18 <sup>D</sup>	0,58 ± 0,006 <sup>B</sup>
E23-4	27,0 ± 0,22 <sup>B</sup>	25,55 ± 0,27 <sup>C</sup>	0,74 ± 0,005 <sup>C</sup>
E23-11	29,45 ± 2,06 <sup>D</sup>	21,88 ± 4,19 <sup>D</sup>	0,51 ± 0,009 <sup>D</sup>
E25-11	32,67 ± 0,36 <sup>C</sup>	24,45 ± 2,37 <sup>C</sup>	0,73 ± 0,03 <sup>C</sup>
E25-12	29,31 ± 0,71 <sup>D</sup>	19,95 ± 1,09 <sup>E</sup>	0,60 ± 0,007 <sup>B</sup>
Trolox (ABTS)	66,67 ± 0,74 <sup>A</sup>	ND	ND
Acide Ascorbique (DPPH)	ND	76,38 ± 1,82 <sup>A</sup>	ND

Les valeurs exprimées sont des moyennes ± SD (n = 3). Dans chaque colonne, les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) en utilisant le test de comparaisons multiples de Tukey, p < 0,05. (ND) : Non déterminé. (EAA) : Equivalent Acide Ascorbique.



**Figure 45.** CI<sub>50</sub> des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d'*Actinomycètes* dans le test ABTS.

## Résultats et Discussions



**Figure 46.** CI<sub>50</sub> des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d'*Actinomycètes* dans le test DPPH.

La production incontrôlée de radicaux libres d'oxygène provoque un stress oxydatif, qui a été identifié comme une cause majeure de problèmes de santé tels que le cancer et d'autres maladies (Kunwar and Priyadarsini, 2011). Les antioxydants peuvent réduire l'accumulation de radicaux libres dans l'organisme, le protégeant ainsi des dommages oxydatifs (Ser et al., 2016). Le genre de bactéries *Streptomyces* a été connu comme l'une des principales sources de composés antioxydants naturels (Cheng et al., 2017; Hosoya et al., 1996; Kato et al., 1989; Shin-ya et al., 1993). Les résultats des activités de piégeage des radicaux libres DPPH et ABTS ont révélé une forte capacité antioxydante des souches de *Streptomyces* testées, ce qui peut suggérer que ces souches sont capables de produire un ou plusieurs antioxydants qui pourraient être utiles pour prévenir le stress oxydatif.

À une concentration de 1 mg / mL, l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ OP101646 a montré la plus grande activité de piégeage de radicaux libres pour les essais ABTS et DPPH. En utilisant la même concentration, Tan et al., (2017) ont obtenu du DPPH (12,03 %) et de l'ABTS (27 %) pour la souche *Streptomyces* sp. MUM 212 extraite par dichlorométhanique en Malaisie.

## Résultats et Discussions

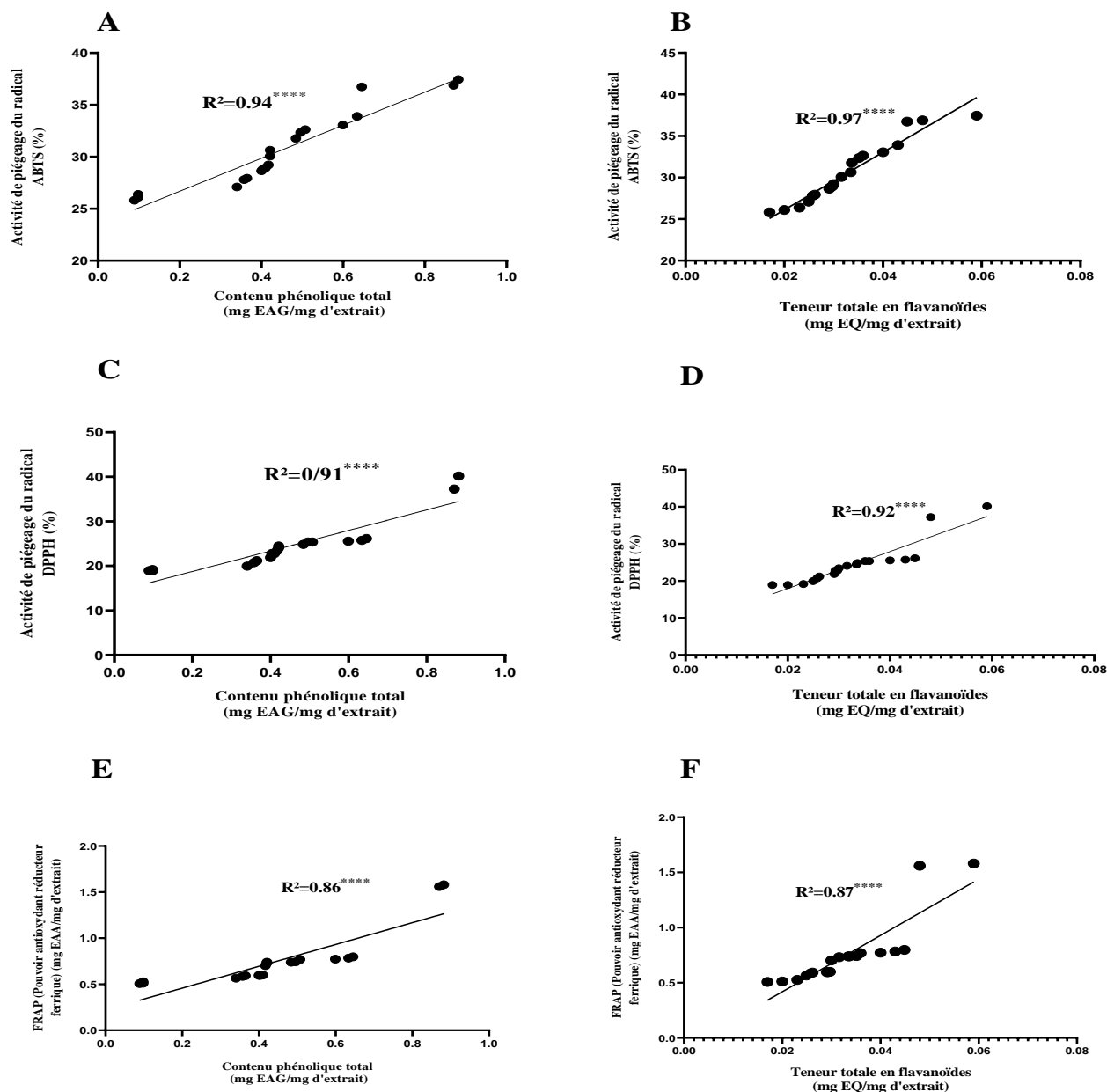
### 1.3 Corrélation entre les teneurs totales en composés phénoliques et en flavonoïdes et les activités antioxydantes (ABTS, DPPH et FRAP).

La corrélation la plus élevée a été observée dans l'activité de piégeage des radicaux ABTS ( $R^2 = 0,96$ ) (**Figures 47A, B**), suivie par l'activité de piégeage des radicaux DPPH ( $R^2 = 0,91$ ) (**Figures 47C, D**), tandis qu'une faible corrélation a été observée dans le test FRAP ( $R^2 = 0,86$ ) (capacité de réduire le Fer ferrique III en Fer ferreux II) (**Figures 47E, F**).

Des études antérieures ont montré que le genre *Streptomyces* peut produire des produits naturels tels que des phénols, des flavonoïdes, des stéroïdes et d'autres composés connus pour leur activité antioxydante (Cheng et al., 2016; Law et al., 2019; Tan et al., 2017). En outre, les composés phénoliques sont connus pour leur activité antioxydante ainsi que d'autres bio-activités telles que des propriétés anti-inflammatoires, antimicrobiennes et antiallergiques (Balasundram et al., 2006; Lü et al., 2010).

L'analyse statistique de cette étude confirme cette hypothèse, car une corrélation positive très significative ( $p < 0,0001$ ) entre les contenus phénoliques et flavonoïdes totaux et la capacité antioxydante analysée par trois tests différents ABTS, DPPH et FRAP.

## Résultats et Discussions



**Figure 47.** Corrélation graphique de Pearson.

(A) Corrélation de Pearson entre l'ABTS et le contenu phénolique total, (B) Corrélation de Pearson entre l'ABTS et la teneur totale en flavonoïdes, (C) Corrélation de Pearson entre le DPPH et le contenu phénolique total, (D) Corrélation de Pearson entre le DPPH et la teneur totale en flavonoïdes, (E) Corrélation de Pearson entre FRAP et le contenu phénolique total, (F) Corrélation de Pearson entre FRAP et la teneur totale en flavonoïdes. "\*\*\*\*" ( $p < 0,0001$ ) hautement significatif entre les tests.

## Résultats et Discussions

### 2 Mise en évidence de l'activité anticancéreuse de 6 isolats d'*Actinomycètes*

#### 2.1 Cytotoxicité des extraits dichlorométhaniques sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468).

Après avoir testé l'activité antimicrobienne et antioxydante, les différents extraits dichlorométhaniques ont été testés contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468) afin de sélectionner les extraits dichlorométhaniques les plus cytotoxiques.

Afin d'examiner cette activité inhibitrice des extraits dichlorométhanique des souches d'*Actinomycètes* sur cette lignée cellulaire de cancer du sein humain, le test au cristal violet a été utilisé dans cette étude pour mesurer la viabilité cellulaire après avoir été traité avec les extraits à différentes concentrations.

Le test au cristal violet est une méthode simple pour détecter la persistance de l'adhésion cellulaire. Dans ce test, le colorant violet se lie aux protéines et à l'ADN des cellules viables, colorant les cellules qui y sont attachées. Les cellules perdent leur adhésion lors de la mort cellulaire et sont donc éliminées de la population cellulaire, ce qui réduit la quantité de coloration au cristal violet dans une culture (Feoktistova et al., 2016).

Les résultats de l'effet inhibiteur des extraits des souches d'*Actinomycètes* ont été illustrés dans la **Figure 48** montrent la viabilité cellulaire de la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468) après 24h d'incubation. Les  $CI_{50}$  correspondantes ont été calculées et les résultats sont présentés dans la **Figure 49** et le **Tableau 26**.

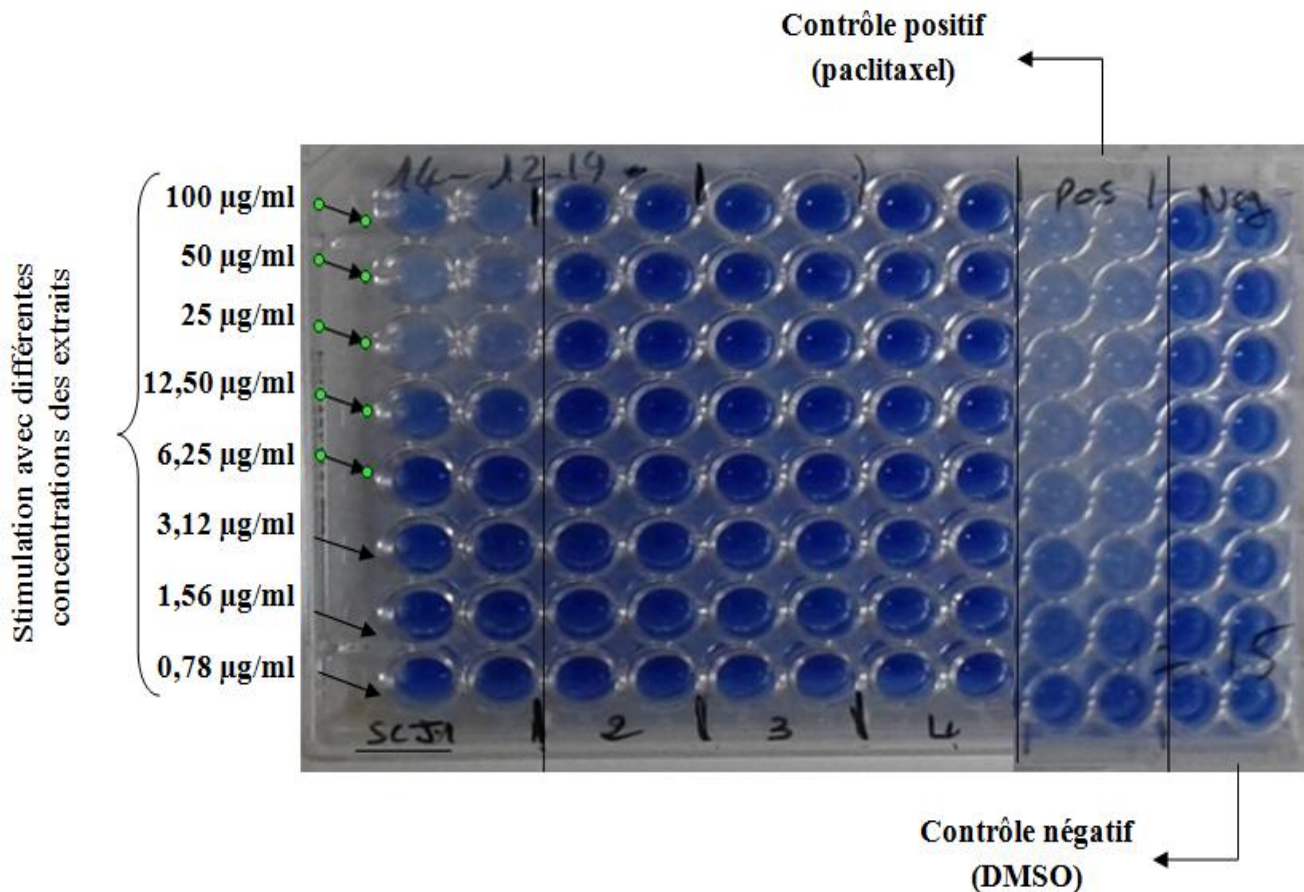
La **Figure 49** et le **Tableau 26** montrent clairement que l'effet de l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ de *Streptomyces* sp. OP101646 sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468) a présenté un degré raisonnable d'activité anticancéreuse entraînant une inhibition de  $62,76 \pm 0,62$  % (cellules viables =  $37,24$  %) avec une valeur de  $CI_{50}$  de  $19,91 \pm 0,20$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Par ailleurs, les autres souches ont montré une faible activité anticancéreuse allant de  $4,76 \pm 0,44$  à  $25,08 \pm 4,45$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ , détectée par le test du cristal violet avec des valeurs de  $CI_{50}$  allant de  $50,63 \pm 8,98$   $\mu\text{g} / \text{mL}$  à  $263,72 \pm 24,29$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ .

Dans une étude similaire, Obeidat, (2017) a rapporté que 9 isolats de *Streptomyces* isolés des sols avaient une cytotoxicité sélective *in vitro* contre les cellules cancéreuses du sein MCF7.

## Résultats et Discussions

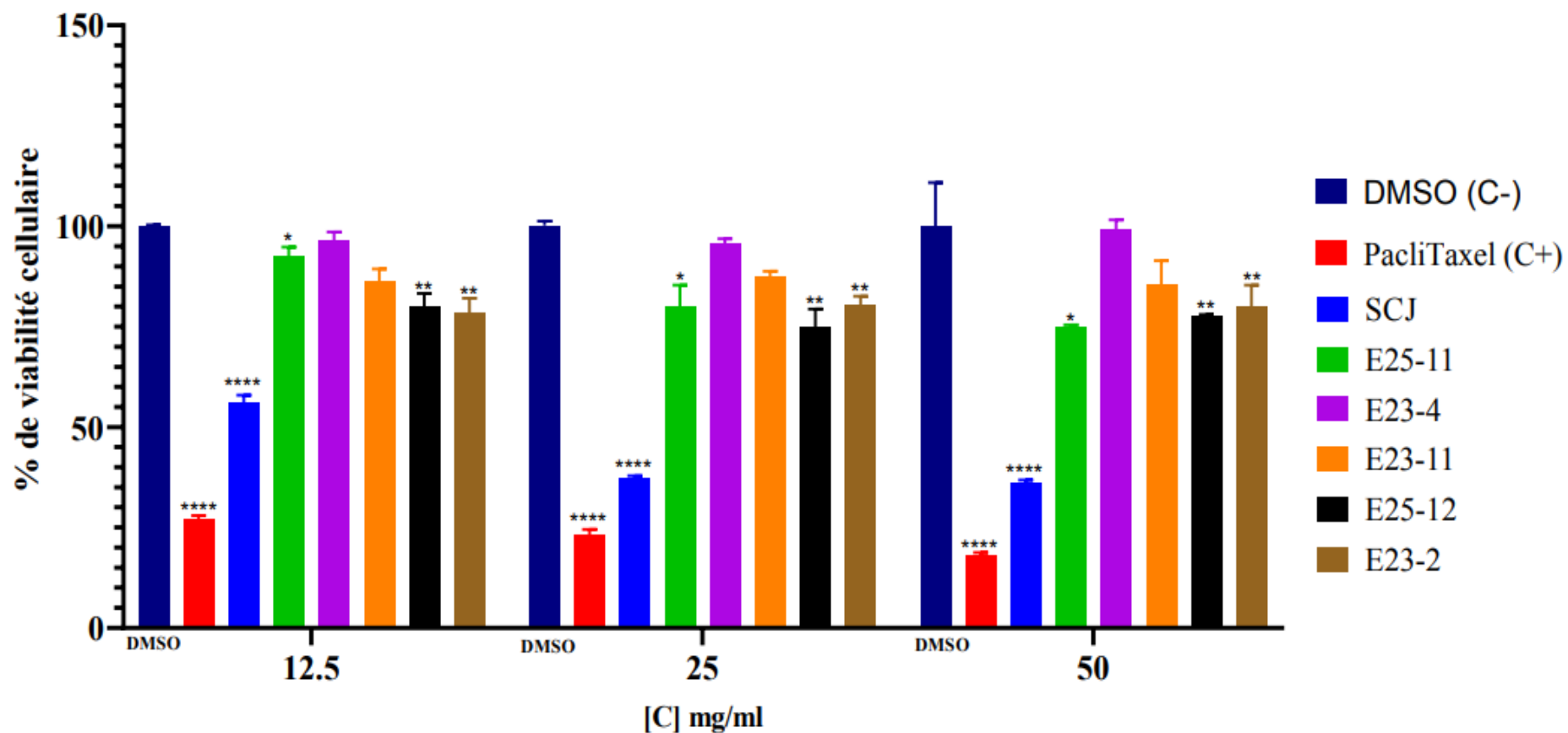
Les métabolites secondaires des *Actinomycètes*, en particulier du genre *Streptomyces*, pourraient être une source importante de nouveaux agents anticancéreux (Yip et al., 2010). La rétamicine, par exemple, aide au traitement de la leucémie humaine (Bieber et al., 1989), la geldanamycine a une forte cytotoxicité *vis-à-vis* le carcinome épidermoïde humain du nasopharynx et du cancer du sein (Jongrungruangchok et al., 2006).

Yip et al., (2010) ont également rapporté que la souche *Streptomyces* sp. H7372.31-2 a induit un effet cyostatique (antiprolifératif) sur les cellules de cancer du sein MCF-7 et MDA-MB-231 sans provoquer de cytotoxicité (mort cellulaire). Par conséquent, notre résultat est très intéressant car la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 provoque une cytotoxicité avec une inhibition de  $62,76 \pm 0,62$  % contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468).



**Figure 48.** Elimination des cellules cancéreuses des plaques de culture cellulaire lors de la mort cellulaire. (L'élimination est caractérisée par la réduction de la quantité de coloration au cristal violet dans la culture).

## Résultats et Discussions



**Figure 49.** Activité anticancéreuse des extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d'*Actinomycètes* contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468) mesurée par le test au cristal violet. Le DMSO et Paclitaxel ont été utilisés comme contrôles négatifs et positifs, respectivement. Les données représentent la moyenne  $\pm$  SD (n = 2). \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*\*p < 0,0001.



## Résultats et Discussions

**Tableau 26.** Pourcentage d'inhibition de la croissance (mort cellulaire) de différents extraits dichlorométhaniques de 6 isolats d'*Actinomycètes* contre la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468) après 24h d'incubation en utilisant le test de cristal de violet.

Extraits dichlorométhanique des isolats d' <i>Actinomycètes</i>	Inhibition(%)	CI <sub>50</sub>	Temps (h)
SCJ	62,76 ± 0,62 <sup>A</sup>	19,91 ± 0,20 <sup>A</sup>	24
E23-2	19,46 ± 2,07 <sup>B</sup>	64,58 ± 6,87 <sup>C</sup>	24
E23-4	4,76 ± 0,44 <sup>D</sup>	263,72 ± 24,29 <sup>E</sup>	24
E23-11	12,68 ± 1,46 <sup>C</sup>	99,24 ± 11,40 <sup>D</sup>	24
E25-11	19,90 ± 5,23 <sup>B</sup>	65,05 ± 17,12 <sup>C</sup>	24
E25-12	25,08 ± 4,45 <sup>B</sup>	50,63 ± 8,98 <sup>B</sup>	24
Contrôle positif (PacliTaxel)	76,86 ± 1,41 <sup>A</sup>	16,26 ± 0,30 <sup>A</sup>	24

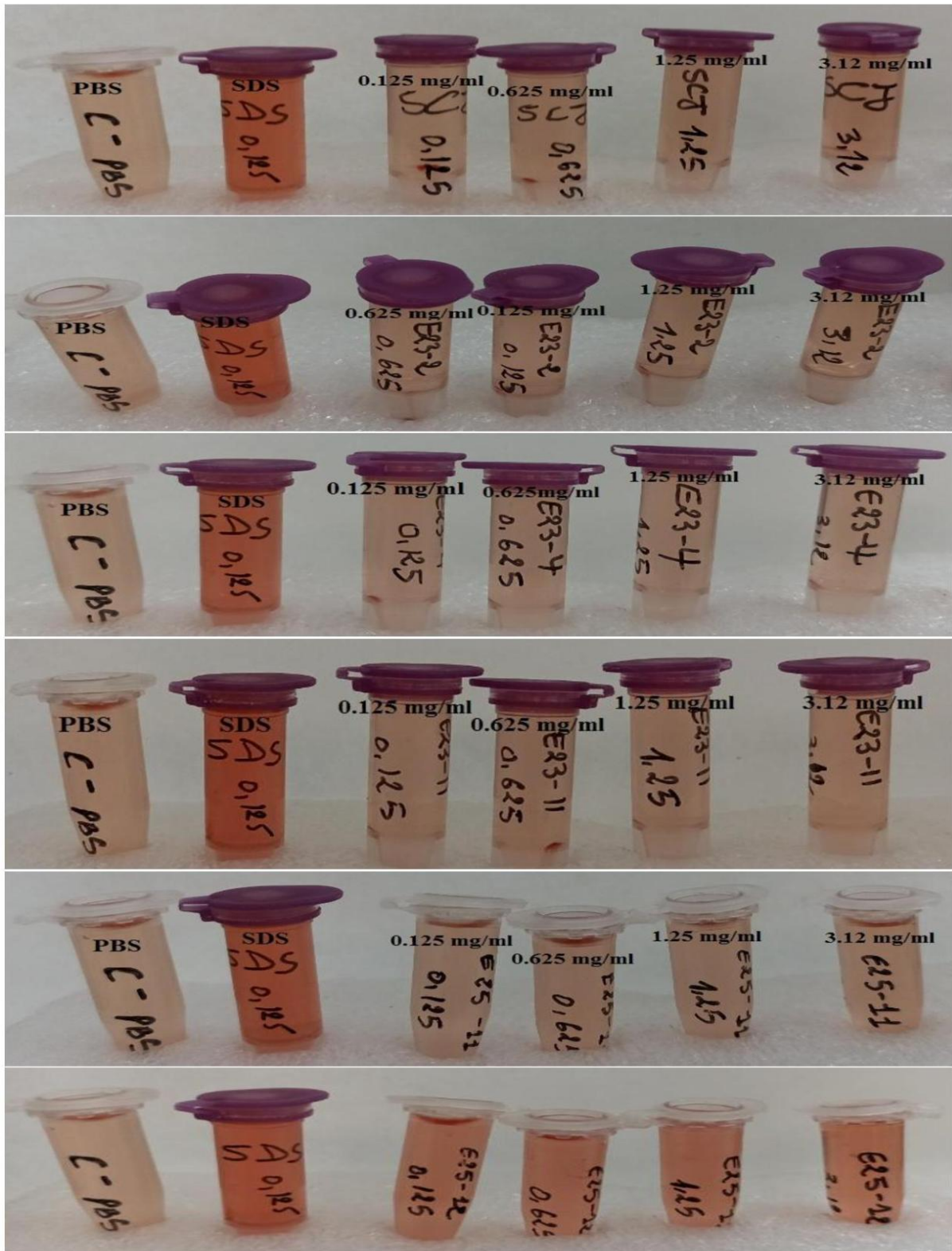
Dans chaque colonne, les moyennes suivies des mêmes lettres ne sont pas significativement différentes selon l'analyse de variance à sens unique (ANOVA) en utilisant le test de comparaisons multiples de Tukey,  $p < 0,05$ .

### 2.2 Evaluation de la toxicité des 6 extraits dichlorométhaniques par test d'hémolyse *vis-à-vis* des cellules humaines normales (globules rouges (RBC)).

Comme le montrent les **Figures 50 et 51**, aucun des extraits dichlorométhaniques testés n'a provoqué d'hémolyse des érythrocytes aux doses testées (0,125, 0,625, 1,25 et 3,12 mg / mL) à l'exception de l'extrait de la souche E25-12 qui a montré un taux d'hémolyse de  $83,25 \pm 1,03$  % à une concentration de 3,12 mg / mL.

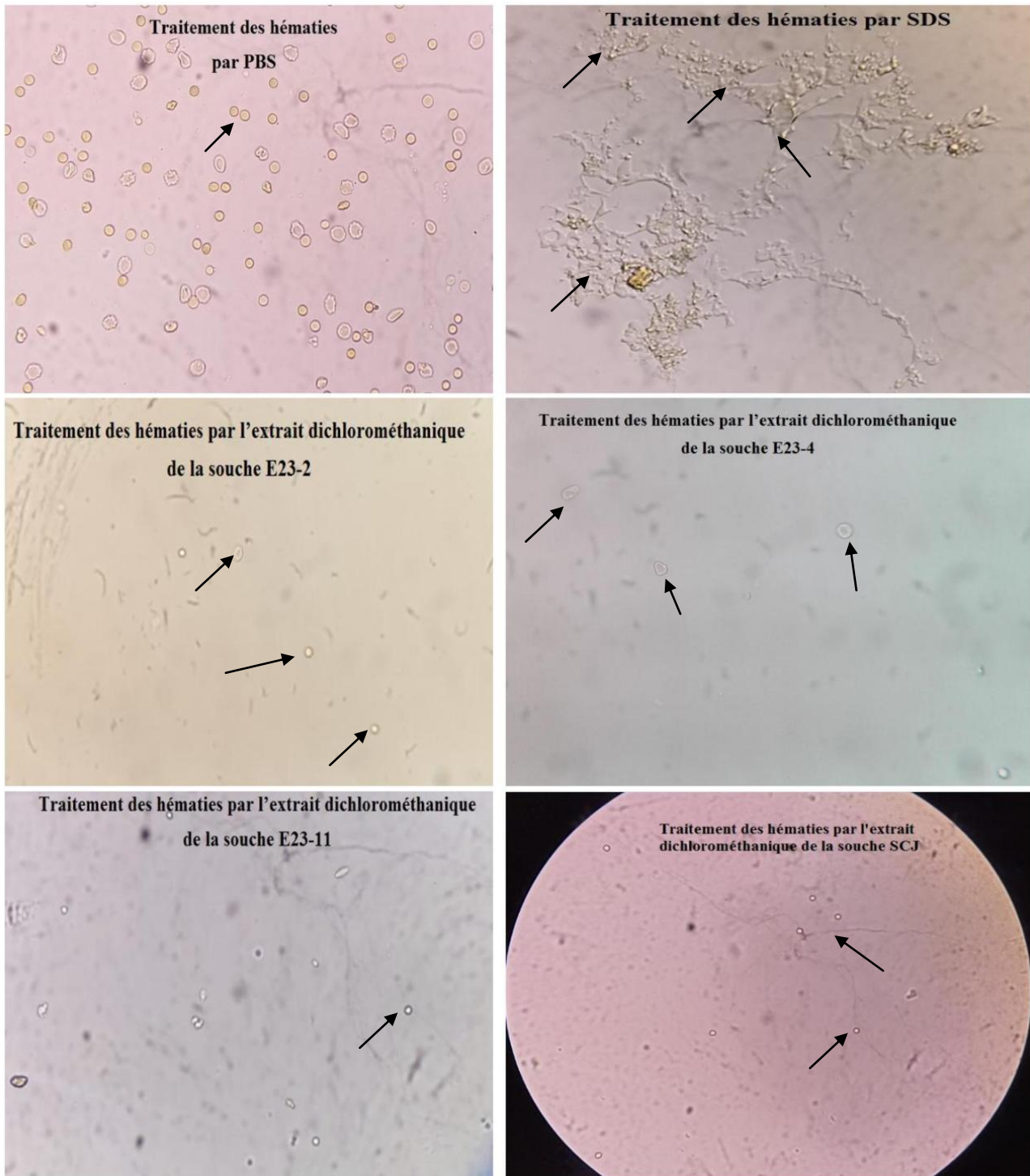
La détermination quantitative par spectroscopie UV-vis a également montré une activité hémolytique négligeable des extraits testés, à l'exception de l'extrait de la souche E25-12 (**Figure 52**). Les résultats de la présente étude montrent que les extraits dichlorométhaniques SCJ, E23-2, E23-4, E23-11 et E25-11 peuvent être considérés comme non toxiques pour l'usage humain car ils n'ont pas montré d'activité hémolytique sur les érythrocytes humains. Selon Saurav and Kannabiran, (2012), il est crucial d'évaluer la stabilité de la membrane après l'exposition à de nouveaux médicaments, et les globules rouges peuvent servir de bon modèle pour ces études de stabilité membranaire.

## Résultats et Discussions



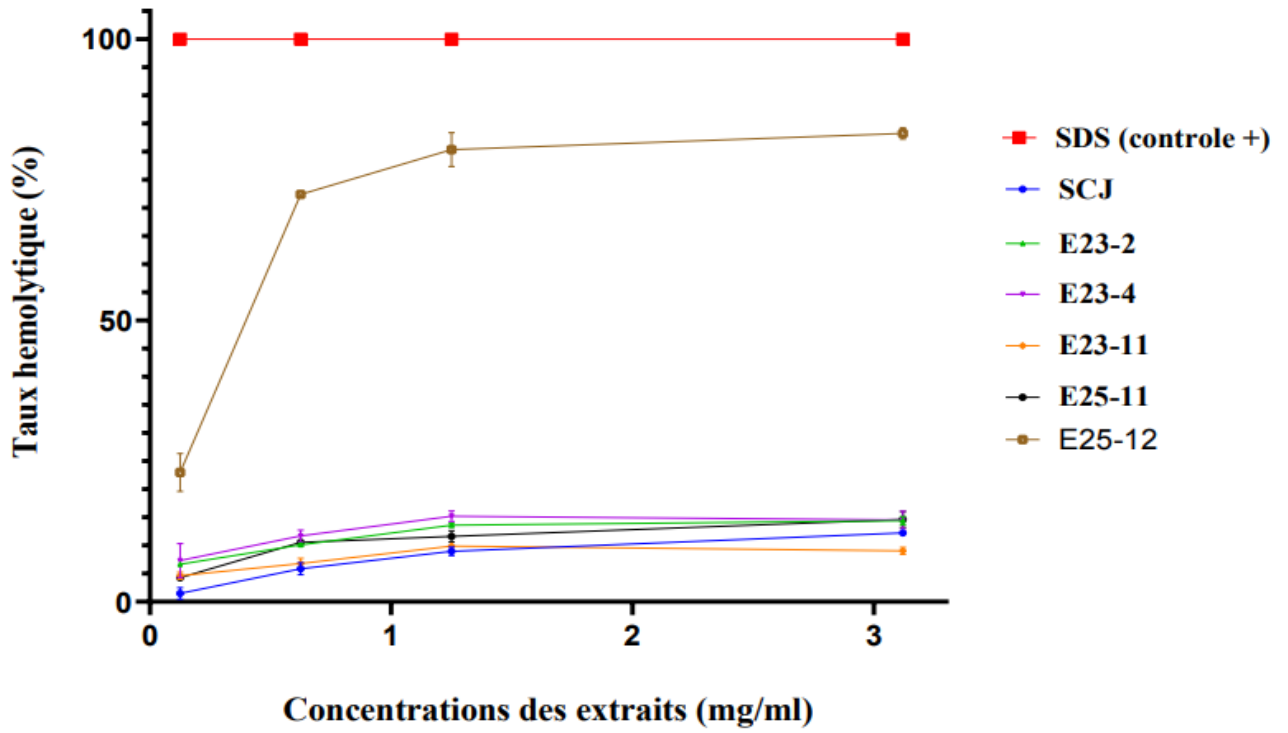
**Figure 50.** Evaluation de l'activité hémolytique de 6 extraits dichlorométhaniques par test d'hémolyse.

## Résultats et Discussions



**Figure 51.** Image microscopique montrant l'effet de 6 extraits dichlorométhaniques, de PBS (contrôle négatif) et SDS (Contrôle positif) sur les globules rouges traitées avec différentes concentrations.

## Résultats et Discussions



**Figure 52.** Evaluation de l'activité hémolytique de 6 extraits dichlorométhane par spectroscopie UV-vis.

## Résultats et Discussions

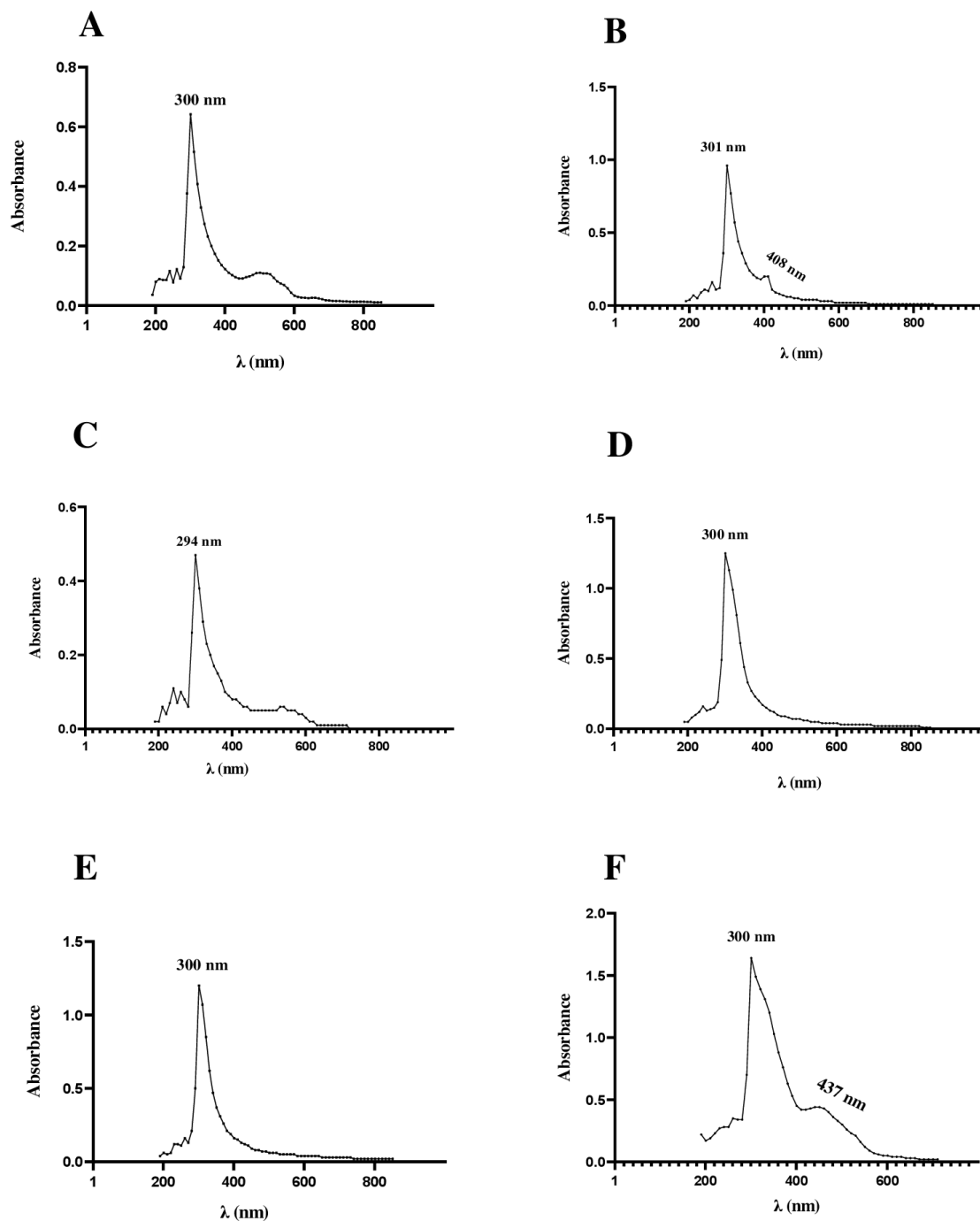
### 2.3 Evaluation de la toxicité des 6 extraits dichlorométhaniques par spectrophotomètre UV-vis à balayage

Les spectres d'absorption des extraits dichlorométhaniques obtenus à partir des 6 souches de *Streptomyces* les plus actives testées n'ont pas présenté les trois pics d'absorption caractéristiques des molécules polyènes.

Deux pics d'absorption ont été obtenus à 300 et 301 nm pour la souche SCJ. Deux pics d'absorption ont été obtenus à 301 et 408 nm pour la souche E23-2. Un seul pic a été obtenu à 294 nm pour la souche E23-4. De plus, un seul pic a été obtenu à 300 nm pour les deux souches E23-11 et E25-11 et deux pics ont été obtenus à 300 et 437 nm pour la souche E25-12.

L'analyse des spectres des extraits actifs dichlorométhaniques de 6 souches de *Streptomyces* sp. a indiqué qu'ils ne contiennent pas de molécules de nature polyénique, qui sont caractérisées par trois maxima d'absorption caractéristiques dans l'UV-visible entre 291 et 405 nm (Aouiche et al., 2012) (**Figure 53**). Ces souches sont très intéressantes, car les molécules polyéniques sont généralement écartées des programmes de recherche sur les nouvelles molécules bioactives en raison de leur toxicité. En effet, il a été montré que les molécules antifongiques de nature polyénique interagissent avec le cholestérol car ce dernier a une structure proche de celle de l'ergostérol, qui est le principal stérol pour les cellules fongiques. Ceci pourrait expliquer la toxicité de ce type de molécules antifongiques (Yilma et al., 2007).

## Résultats et Discussions



**Figure 53.** Spectres UV-visible pour les 6 extraits bruts actifs dichlorométhaniques.

- (A) : extrait brut de *Streptomyces* sp. SCJ OP101646.
- (B) : extrait brut de *Streptomyces* sp. E23-2 OM883988.
- (C) : extrait brut de *Streptomyces* sp. E23-4 OM883990.
- (D) : extrait brut de *Streptomyces* sp. E23-11 OM883994.
- (E) : extrait brut de *Streptomyces* sp. E25-11 OM883997.
- (F) : extrait brut de *Streptomyces bellus* E25-12 OM883998.

## **Chapitre IV**

**Identification des molécules à activités biologiques  
(antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses), de  
l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp.**

**SCJ OP101646**

## Résultats et Discussions

L'objectif de ce chapitre est d'identifier les métabolites secondaires présents dans l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ OP101646, qui a montré les plus grandes activités antimicrobienne, antioxydante et anticancéreuse par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (CPG-SM).

### 1 Analyse CPG-SM de l'extrait de la souche SCJ *Streptomyces* sp. OP101646.

L'analyse CPG-SM de l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646, qui a montré une très forte activité antimicrobienne, antioxydante et anticancéreuse par rapport aux autres souches testées, nous a permis d'identifier un total de 21 composés volatils dont l'élution a duré entre 9,197 et 49,381 minutes (**Figures 54, 55, 56, 57, 58 et 59**). Ces 21 composés identifiés ont été reconnus pour leurs activités antimicrobiennes, antifongiques, antioxydantes, anti-tumorales et autres activités biologiques (**Tableau 27**).

D'après cette analyse, les dérivés d'hydrocarbures, les dérivés de l'indole, les dérivés du tert-butylidiméthylsilyl (TBDMS), la pyrrolopyrazine, le dihydropyranones sont les principales classes de composés présents dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646.

Les pyrrolopyrazines présentent un large éventail de bio-activités, notamment des propriétés antioxydantes, anti-tumorales, anti-angiogéniques et antimicrobiennes (H.-L. Ser et al., 2015). Selon l'analyse CPG-SM, un seul composé de pyrrolopyrazine a été détecté dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 : Pyrrolo[1,2-a] pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl). Dans des études extérieures, Tan et al., (2015) ont identifié la pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl) comme étant présente dans *Streptomyces* sp. MUM 256, isolée de la forêt de mangroves en Malaisie, et ont suggéré que ce composé pourrait être responsable des activités antioxydantes et anticancéreuses de cette espèce.

Par conséquent, les bonnes activités antioxydantes et cytotoxiques présentées par l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ OP101646 par rapport aux autres extraits pourraient être principalement dues à la présence de ce composé pyrrolopyrazine.

Le composé acide benzène acétique détecté dans l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ OP101646 a déjà été signalé comme possédant une activité antifongique contre les phytopathogènes (Hwang et al., 2001; Nahar et al., 2005; Wook Kim et al., 2004).



## Résultats et Discussions

De même, le composé Indole-3-carboxylic acid, 5-methoxy-2-methyl-1-(3-methylphenyl)-, ethyl ester détecté dans l'extrait SCJ a été précédemment signalé comme possédant diverses activités biologiques, à savoir des activités anti-convulsivantes, antioxydantes, anticancéreuses, antibactériennes, anti-inflammatoires, antituberculeuses et antipaludiques (Gamir et al., 2012; Kumar and Ritika, 2020).

Un autre composé détecté dans l'extrait SCJ, 1, 2-Benzisothiazol-3-amine, TBDMS derivative qui est l'un des dérivés tert-butyldiméthylsilyl (TBDMS) a été considéré comme des biomolécules antifongiques, antioxydantes et antiproliférative (Hameed et al., 2016; Maher et al., 2021).

Globalement, la plupart des composés chimiques identifiés par CPG-SM sont bien connus pour leurs activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses. Par conséquent, Il est possible que tous les composés enregistrés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ OP101646 testée soient responsables de la diversité des activités biologiques présentées par cette souche.

En outre, les activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses les plus élevées présentées par l'extrait de dichlorométhanique de la souche SCJ pourraient être dues à l'effet synergique des métabolites secondaires présents dans l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ OP101646. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Das et al., (2018b) qui ont montré que l'extrait d'acétate d'éthyle de la souche EA-PWS52 de *Streptomyces* sp. est composé de molécules bioactives telles que l'acide benzène-acétique, les dérivés de la pyrrolizidine, les composés hétérocycliques et d'autres composés qui peuvent présenter des activités antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses.

## Résultats et Discussions

**Tableau 27.** Composés volatils identifiés par CPG-SM à partir d'un extrait brut dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646.

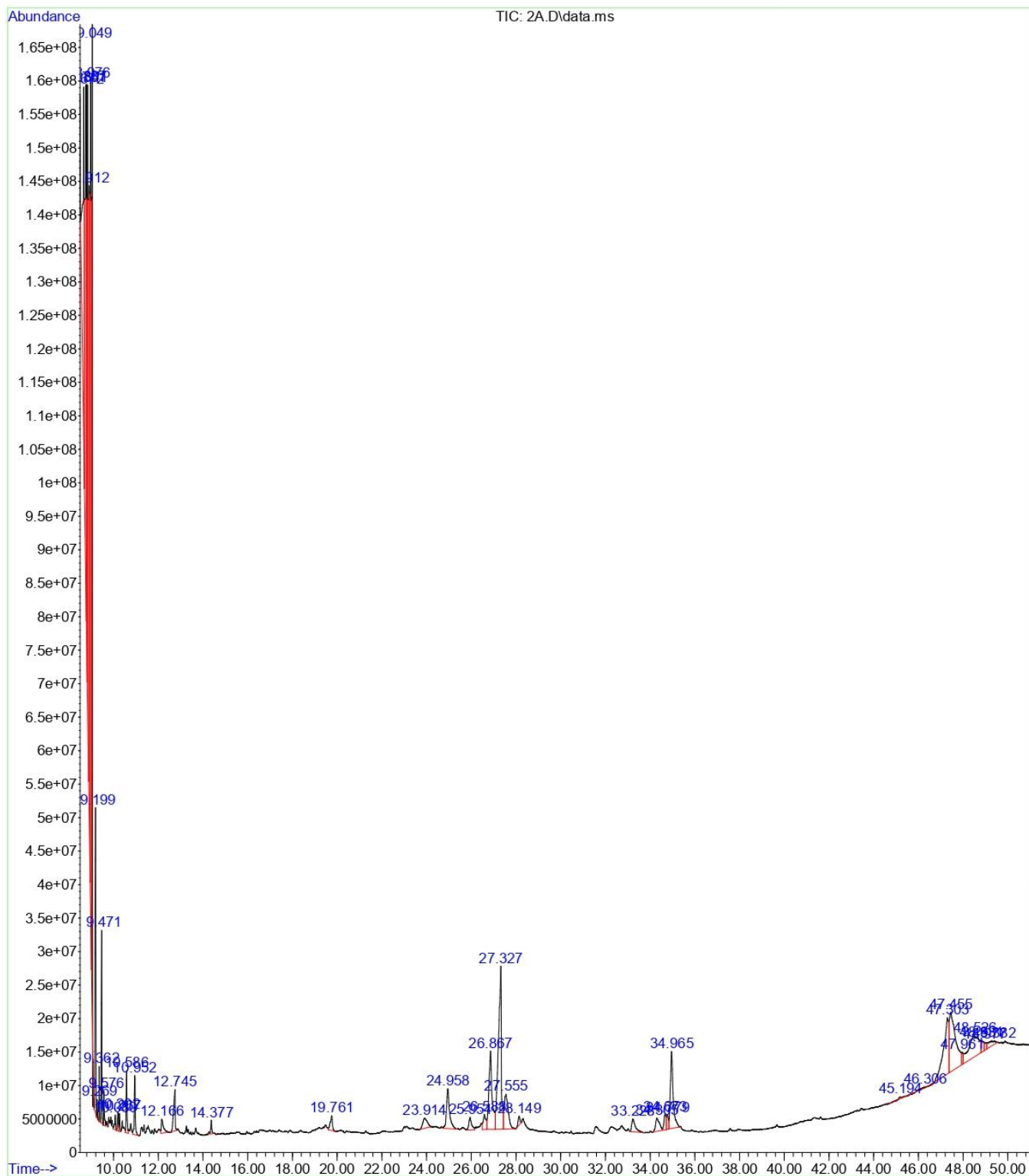
TR : temps de rétention ; P.M. : poids moléculaire.

TR (temps)	Surface (%)	P.M. (g/mol)	Formule moléculaire	Nom du composé	Bio-activité rapportée	Références
9,197	3,37	94,20	C <sub>2</sub> H <sub>6</sub> S <sub>2</sub>	Disulfide, dimethyl.	Antioxydant, antifongique, effet analgésique	(Morales-López et al., 2016; Pozsgai et al., 2017; Tyagi et al., 2020).
9,366	0,28	85,13	C <sub>3</sub> H <sub>3</sub> NS	1,3-thiazole	Activité antibactérienne, anti-inflammatoire, anti-tumorale et cytotoxique.	(Gürsoy and Güzeldemirci, 2007; Sharma et al., 2009; Tsuji and Ishikawa, 1994)
9,467	1,25	94,10	C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> OH	Phenol	Activité antimicrobienne, activité antibactérienne et activité antioxydante	(Floris et al., 2021)
9,580	0,30	112,08	C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Maleic hydrazide	Effet anti-tumorigène	(Akin, 1976)
10,267	0,18	126,11	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Methyl 2-furoate	Antifongique	(Hashim et al., 2020)
10,583	0,67	126,11	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	Maltol.	Antioxydant, anti-inflammatoire et anti-tumoral.	(Han et al., 2015).
10,955	0,76	144,12	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>4</sub>	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-	Antioxydant	(Yu et al., 2013).
12,746	0,80	136,14	C <sub>8</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	Benzene acetic acid.	Antifongique, antimicrobien et antioxydant	(Hwang et al., 2001; Kim et al., 2004; Nahar et al., 2005).
19,767	0,40	222,24	C <sub>12</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	DiethylPhthalate.	Antimicrobien, antifongique	(Mangamuri et al., 2016).
24,962	1,57	283,36	C <sub>15</sub> H <sub>25</sub> NO <sub>4</sub>	l-Proline, N-allyloxycarbonyl-, isohexyl ester	Non encore rapporté	-
26,866	3,22	409,6	C <sub>25</sub> H <sub>47</sub> NO <sub>3</sub>	l-Leucine, N-cyclopropylcarbonyl-, pentadecyl ester.	Antibactérien	(Kumaran et al., 2020).
27,328	6,21	154,3	C <sub>4</sub> H <sub>10</sub> S <sub>3</sub>	Diethyltrisulphide.	Antimicrobien	(Wook Kim et al., 2004)

## Résultats et Discussions

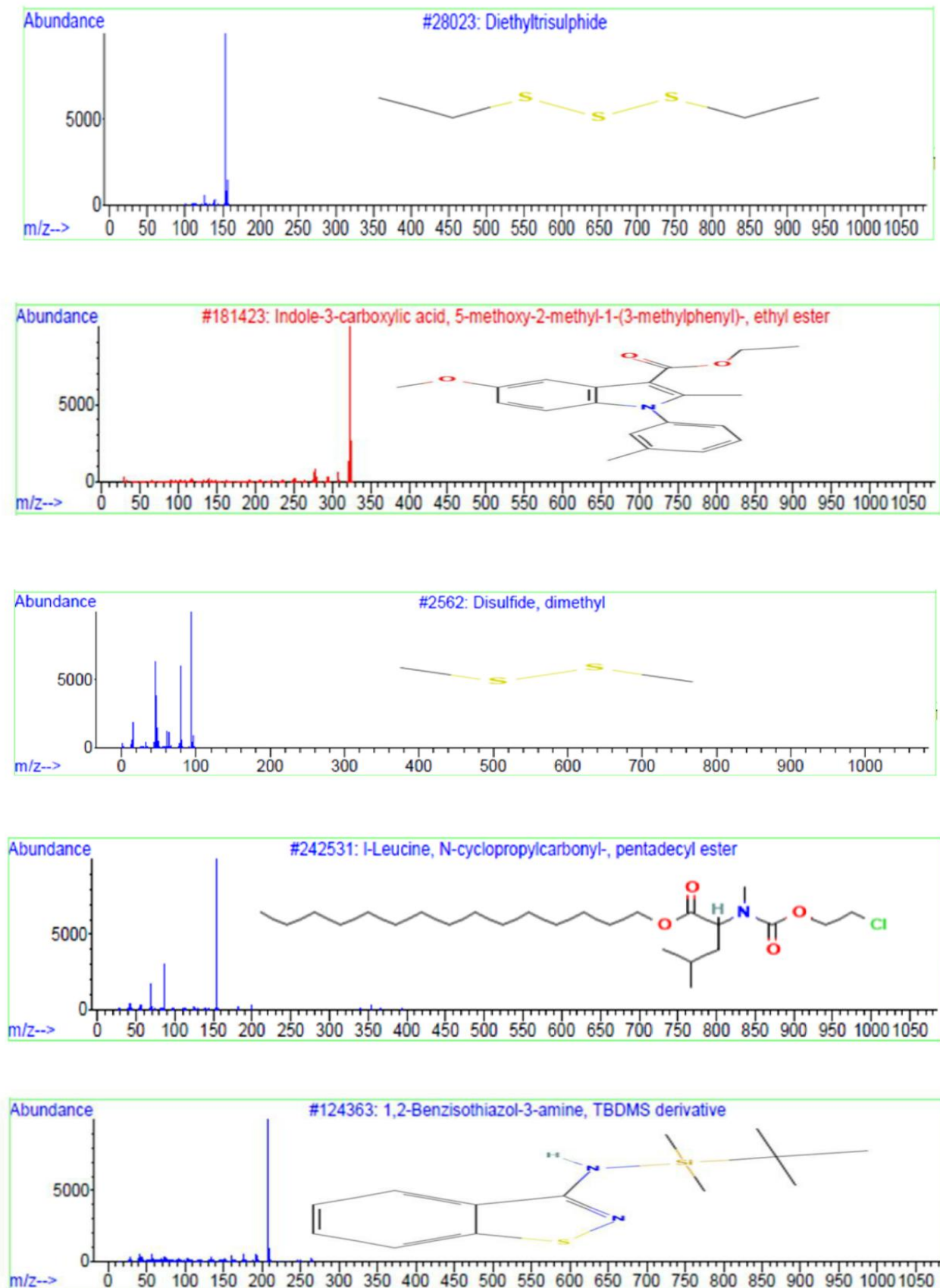
<b>27,553</b>	1,83	451,68	C <sub>27</sub> H <sub>49</sub> NO <sub>4</sub>	l-Proline, N-allyloxycarbonyl-, octadecyl ester	Non encore rapporté	-
<b>34,968</b>	2,77	244,29	C <sub>14</sub> H <sub>16</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-3-(phenylmethyl).	Antifongique, antioxydant et antibactérien	(Raharja et al., 2019; Sanjenbam and Kannabiran, 2016; H. L. Ser et al., 2015).
<b>47,307</b>	3,54	323,41	C <sub>18</sub> H <sub>17</sub> N <sub>3</sub> OS	Acetamide, N-[4-[2-[(3-methylphenyl) amino]-4-thiazolyl]phenyl]-	Activité anticancéreuse	(Fallah-Tafti et al., 2011)
<b>47,454</b>	4,76	323,39	C <sub>20</sub> H <sub>21</sub> NO <sub>3</sub>	Indole-3-carboxylic acid, 5-methoxy-2-methyl-1-(3-methylphenyl)-, ethyl ester.	Anticonvulsif, antioxydant, anticancéreux, antibactérien et anti-inflammatoire. Antituberculeux, antipaludique Médiateur de résistance contre les pathogènes nécrotrophes	(Gamir et al., 2012; Kumar and Ritika, 2020).
<b>47,961</b>	0,22	222,40	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> OSi	Thymol, TMS derivative	Antibactérien, antifongique, Antioxydant et anticancéreux	(Baath, 1996; Kang et al., 2015; Marchese et al., 2016).
<b>48,524</b>	0,36	264,46	C <sub>13</sub> H <sub>20</sub> N <sub>2</sub> SSi	1, 2-Benzisothiazol-3-amine, TBDMS derivative.	Antifongique, antioxydant et antiprolifératif.	(Maher et al., 2021; Ubaid et al., 2016).
<b>48,829</b>	0,36	222,40	C <sub>13</sub> H <sub>22</sub> OSi	Thymol, TMS derivative	Antibactérien, antifongique, antioxydant et anticancéreux.	(Bååth, 1996; Kang et al., 2015; Marchese et al., 2016)
<b>48,975</b>	0,21	222,47	C <sub>12</sub> H <sub>22</sub> Si <sub>2</sub>	1,2-Bis (trimethylsilyl) benzene.	Antimicrobienne, antioxydante et antibactérienne	(Naveen and Kavitha, 2021).
<b>49,381</b>	0,44	207,27	C <sub>15</sub> H <sub>13</sub> N	Benzo[h]quinoline, 2,4-dimethyl-	anti-inflammatoire, antioxydant, anti-VIH, antifongique, traitement des maladies neurodégénératives, antituberculeux et anticancéreux.	(Afzal et al., 2015; Bongarzone and Bolognesi, 2011; Keri and Patil, 2014; Musiol, 2013; Orhan Puskullu et al., 2013)

## Résultats et Discussions

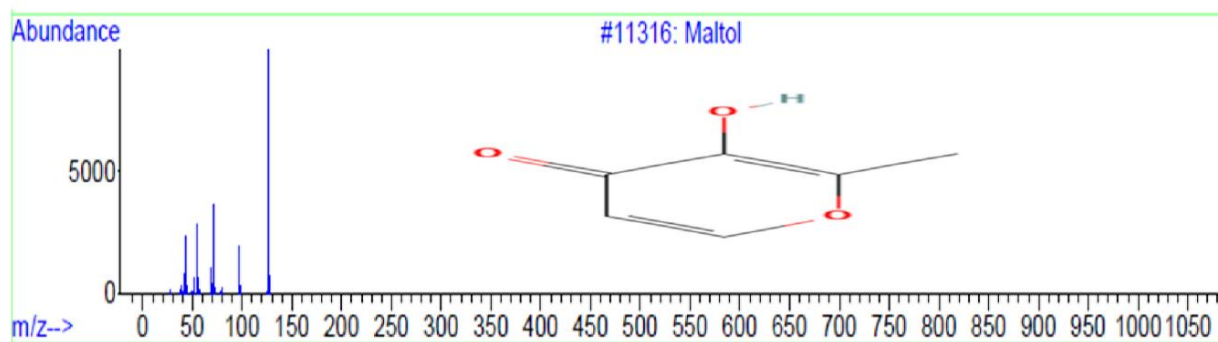
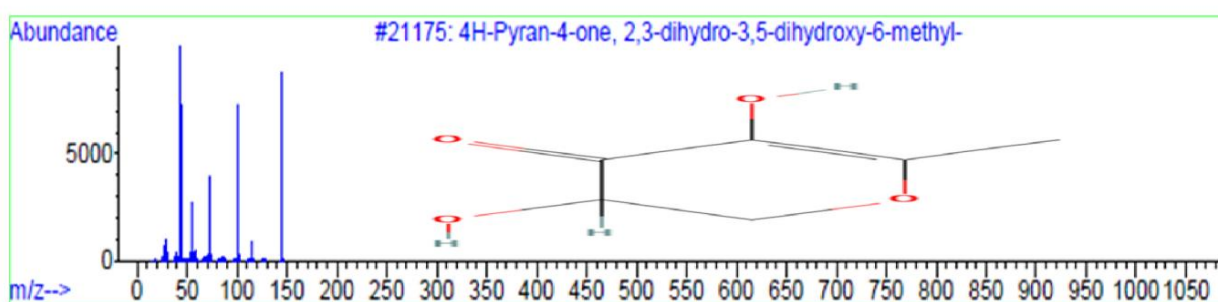
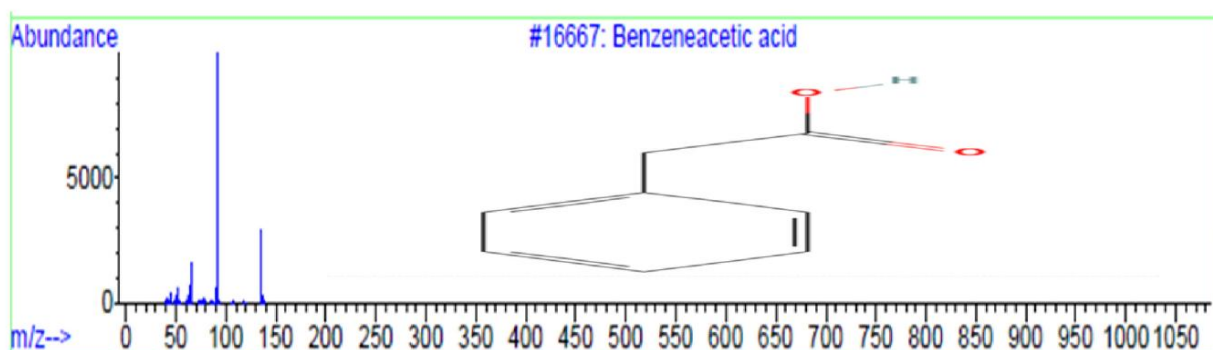
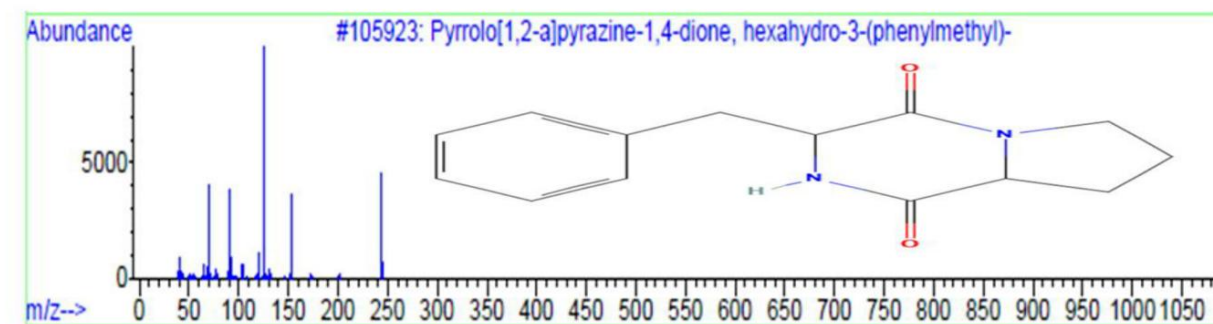


**Figure 54.** CPG-SM de l'extrait brut dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 avec des pics indiquant la présence de composés bioactifs (selon la base de données NIST).

## Résultats et Discussions

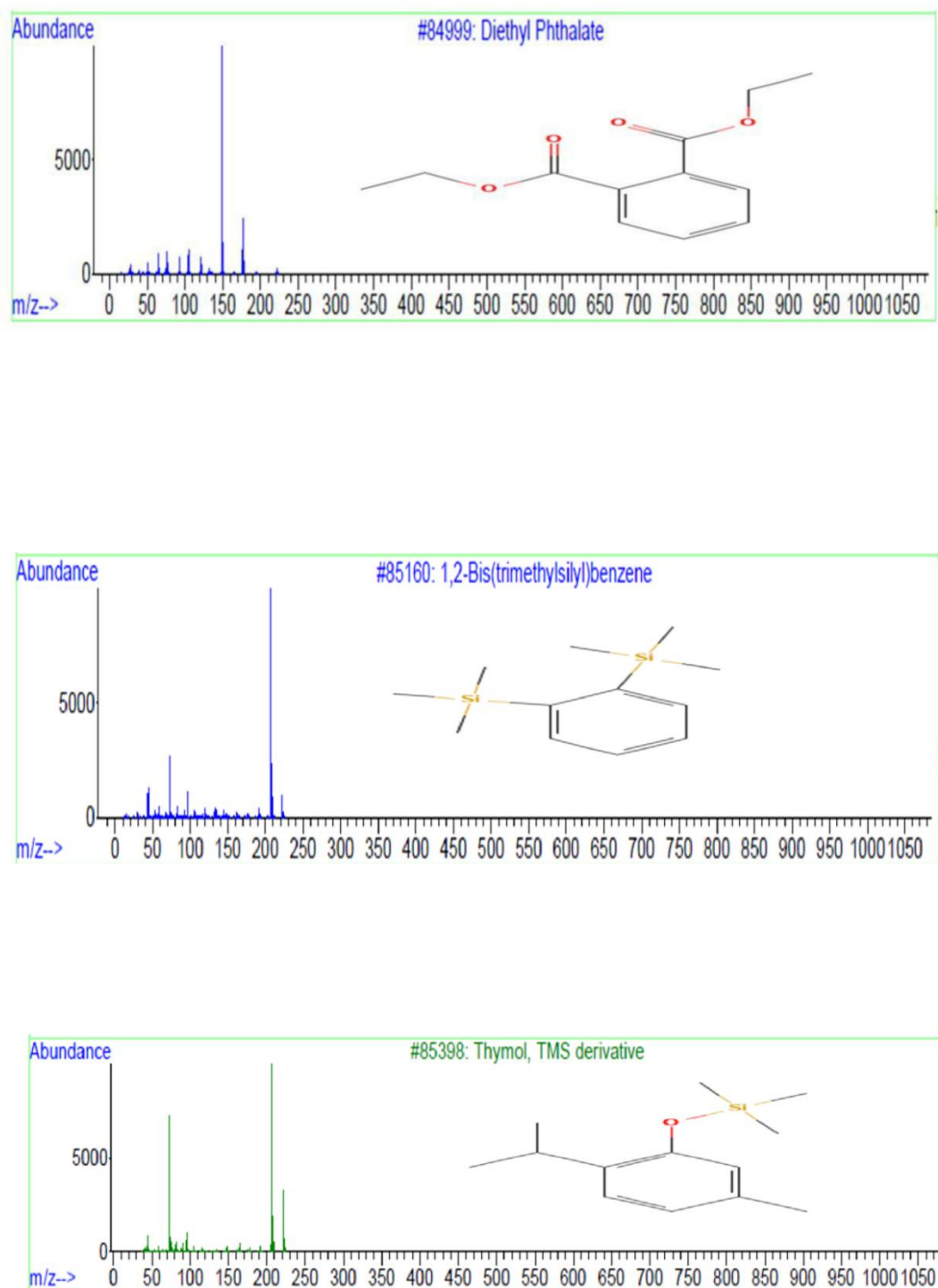


**Figure 55.** Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST).



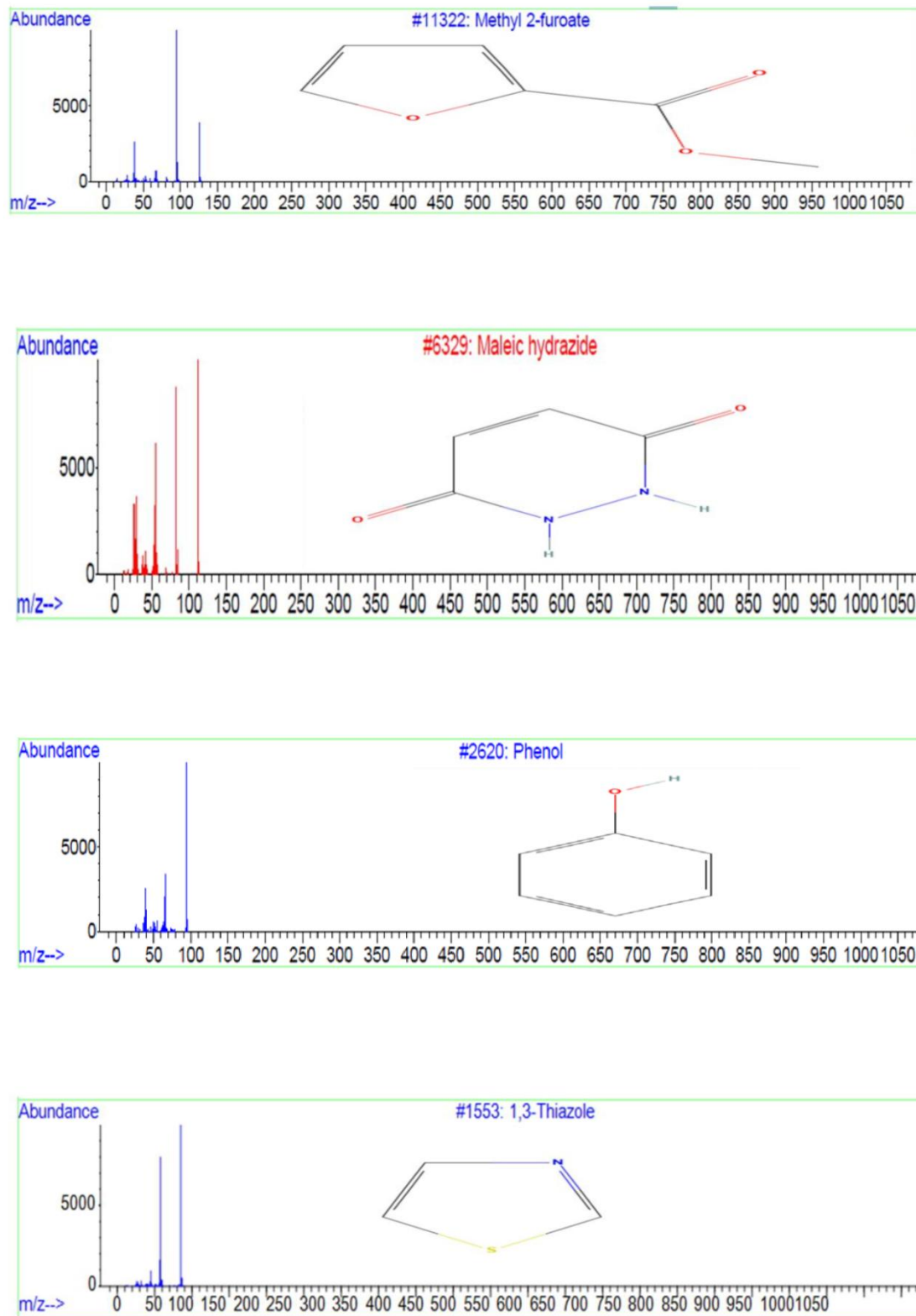
**Figure 56.** Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST).

## Résultats et Discussions



**Figure 57.** Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST).

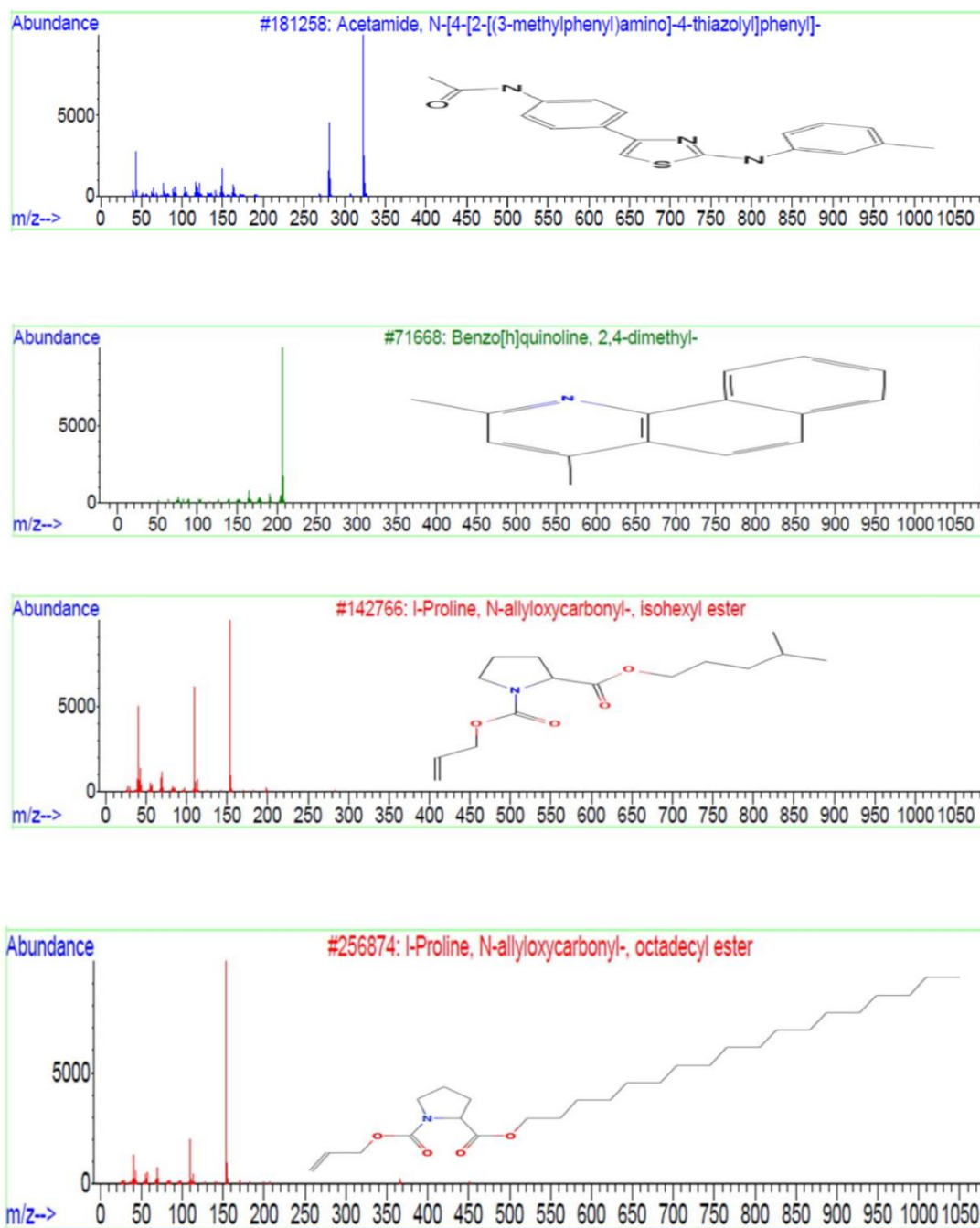
## Résultats et Discussions



**Figure 58.** Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST).



## Résultats et Discussions



**Figure 59.** Structures chimiques des métabolites secondaires détectés dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 analysé par CPG-SM (selon la base de données NIST).

**Conclusion générale et perspectives**

## Conclusion générale et perspectives

En conclusion, le genre *Streptomyces* reste une excellente source pour la production de composés bioactifs naturels, puisque les deux tiers de tous les nouveaux composés bioactifs découverts chez les *Actinobactéries* entre 2015 et 2019 ont été obtenus à partir du genre *Streptomyces* (Jose et al., 2021). Cette étude décrit l'isolement des souches d'*Actinomycètes*, en particulier du genre *Streptomyces* à partir de deux habitats terrestre distincts et microbiologiquement inexploré du Nord- Est du Maroc (un écosystème naturel normal (jardin Titt Mellil appartenant à la région Casablanca-Settat, Maroc et un autre écosystème froid (trois sites froids différents dans la région de Fès-Meknès, Maroc)).

L'identification des isolats d'*Actinomycètes* a été complétée par le séquençage des gènes d'ARNr 16S. En effet, la comparaison des séquences d'ARNr 16S des isolats avec celles de la base de données « NCBI Blast » a montré que tous les isolats (12 isolats d'*Actinomycètes*) testés appartiennent au genre *Streptomyces* (100 %). Parmi ces 12 isolats, 6 (E23-3, E23-9, E23-10, E24-9, E25-12 et SCJ) ont été identifiés jusqu'au niveau de l'espèce. Ces 6 isolats présentaient un pourcentage très élevé de similarité au niveau de l'espèce (> 99 %). En effet, l'isolat E23-3 présentait 99,06 % de similarité avec *Streptomyces africanus*, l'isolat E23-9 était similaire à 99,28 % à *Streptomyces galilaeus*, E24-9 présentait 99,63 % de similarité avec *Streptomyces amritsarensis*, SCJ était similaire à 99,78 % à *Streptomyces coeruleofuscus*, tandis que les isolats E23-10 et E25-12 étaient étroitement similaires à la souche de *Streptomyces bellus*.

Les souches *Streptomyces* sp. SCJ OP101646, E23-2 OM883988, E23-4 OM883990, E23-11 OM883994, E25-11 OM883997 et *Streptomyces bellus* E25-12 OM883998 ont montré une activité antimicrobienne importante contre les souches bactériennes multirésistantes (MBR) et les champignons phytopathogènes.

Les métabolites secondaires produites par ces souches peuvent également piéger plusieurs radicaux libres, notamment les radicaux DPPH et ABTS et de réduire le Fer ferrique (III) en Fer ferreux (II) par test FRAP. En comparaison avec les autres extraits dichlorométhaniques (E23-2 OM883988, E23-4 OM883990, E23-11 OM883994, E25-11 OM883997 et *Streptomyces bellus* E25-12 OM883998), l'extrait dichlorométhanique de la souche souches *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 a montré la plus grande activité de piégeage des radicaux libres contre le DPPH et l'ABTS. En ce qui concerne la capacité antioxydante réductrice du fer, l'extrait dichlorométhanique de la souche SCJ était le plus élevé par rapport aux autres extraits dichlorométhanique.

## Conclusion générale et perspectives

Les composés phénoliques et flavonoïdes présents dans les extraits pourraient être les principaux constituants responsables de leurs propriétés antioxydantes. L'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 a montré la teneur totale en composés phénoliques et flavonoïdes les plus élevés par rapport aux autres extraits dichlorométhaniques. Les composés phénoliques sont connus pour leur activité antioxydante (Balasundram et al., 2006; Lü et al., 2010). L'analyse statistique confirme cette hypothèse, car une corrélation positive très significative ( $p < 0,0001$ ) entre les teneurs totales en composés phénoliques et flavonoïdes et la capacité antioxydante analysée par trois tests différents ABTS, DPPH et FRAP.

En outre, l'effet de l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 sur la lignée cellulaire de carcinome mammaire humain triple négative (MDA-MB-468) a présenté un degré raisonnable d'activité anticancéreuse par rapport aux autres extraits dichlorométhaniques, en provoquant une inhibition de  $62,76 \pm 0,62$  % (cellules viables =  $37,24$  %) avec une valeur  $CI_{50}$  de  $19,91 \pm 0,20$   $\mu\text{g} / \text{mL}$ . Ainsi, il s'avère nécessaire d'approfondir l'étude sur d'autres lignées cellulaire de carcinome mammaire humain et de réaliser le test de toxicité *in vivo* afin de confirmer nos résultats *in vitro* et par la suite comprendre le mécanisme d'action intracellulaire.

Les résultats de la cytotoxicité des extraits dichlorométhaniques SCJ, E23-2, E23-4, E23-11 et E25-11 sur les cellules normales peuvent être considérés comme non toxiques pour l'homme car ils n'ont pas montré d'activité hémolytique sur les érythrocytes humains.

L'analyse des spectres UV-vis des extraits actifs dichlorométhaniques de 6 souches de *Streptomyces* sp. a indiqué qu'ils ne contiennent pas de molécules de nature polyénique, ces souches isolées sont très intéressantes, car les molécules polyéniques sont généralement écartées des programmes de recherche sur les nouvelles molécules bioactives en raison de leur toxicité.

Les différents composés bioactifs identifiés par CPG-SM dans l'extrait dichlorométhanique de la souche *Streptomyces* sp. SCJ OP101646 ont un large spectre d'activités pharmacologiques et peuvent être utilisés pour traiter les infections bactériennes multirésistantes, et pour contrer les maladies causées par le stress oxydatif telles que le cancer, les maladies cardiovasculaires, les maladies rénales et les maladies neurologiques. Ces composés bioactifs identifiés nécessitent des études supplémentaires concernant leurs mécanismes d'action au niveau

## **Conclusion générale et perspectives**

intracellulaire. En outre, les orientations futures consisteraient à purifier les composés les plus intéressants en termes de dépistage antimicrobien, insecticide, antioxydant et anti-tumoral à l'aide de la spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (FTIR), de la chromatographie liquide à haute performance (HPLC), de la spectrométrie de masse à haute résolution (HRMS) et de la reconfirmation de la structure par résonance magnétique nucléaire (RMN), et à étudier les voies impliquées dans les propriétés antimicrobiennes, antioxydantes et anticancéreuses de ces 21 composés identifiés.

## Références bibliographiques

- Omura, S., Ikeda, H., Ishikawa, J., Hanamoto, A., Takahashi, C., Shinose, M., Takahashi, Y., Horikawa, H., Nakazawa, H., Osonoe, T., others, 2001. Genome sequence of an industrial microorganism *Streptomyces avermitilis*: deducing the ability of producing secondary metabolites. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 98, 12215–12220.
- Abraham, E.P., Chain, E.B., 1940. An Enzyme from Bacteria able to Destroy Penicillin. *Nature* 146, 837.
- Afzal, O., Kumar, S., Haider, M.R., Ali, M.R., Kumar, R., Jaggi, M., Bawa, S., 2015. A review on anticancer potential of bioactive heterocycle quinoline. *Eur. J. Med. Chem.* 97, 871–910. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.07.044>
- Ait Barka, E., Vatsa, P., Sanchez, L., Vaillant-Gaveau, N., Jacquard, C., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016. Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/MMBR.00019-15>
- Akin, F.J., 1976. Anti-tumorigenic effect of maleic hydrazide on mouse skin. *J. Agric. Food Chem.* 24, 672–674. <https://doi.org/10.1021/jf60205a003>
- Al-Dhabi, N.A., Esmail, G.A., Ghilan, A.-K.M., Arasu, M.V., Duraipandiyar, V., Ponmurugan, K., 2020. Characterization and fermentation optimization of novel thermo stable alkaline protease from *Streptomyces* sp. Al-Dhabi-82 from the Saudi Arabian environment for eco-friendly and industrial applications. *J. King Saud Univ.* 32, 1258–1264.
- Al-Sadi, A.M., Al-Ghaithi, A.G., Al-Fahdi, N., Al-Yahyai, R., 2014. Characterization and pathogenicity of fungal pathogens associated with root diseases of citrus in Oman. *Int. J. Agric. Biol.* 16, 371–376.
- Al-Shaibani, M.M., Mohamed, R.M.S.R., Sidik, N.M., Enshasy, H.A. El, Al-Gheethi, A., Noman, E., Al-Mekhlafi, N.A., Zin, N.M., 2021. Biodiversity of secondary metabolites compounds isolated from phylum actinobacteria and its therapeutic applications. *Molecules* 26, 1–22. <https://doi.org/10.3390/molecules26154504>
- Amanullah, Jüsten, Davies, Paul, Nienow, Thomas, 2000. Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem. Eng. J.* 5 2, 109–114.
- Anderson, A.S., Wellington, E.M.H., 2001. The taxonomy of *Streptomyces* and related genera. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51, 797–814. <https://doi.org/10.1099/00207713-51-3-797>
- Aouiche, A., Sabaou, N., Meklat, A., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., 2012. Activité antimicrobienne de *Streptomyces* sp. PAL111 d'origine saharienne contre divers microorganismes cliniques et toxigènes résistants aux antibiotiques. *J. Mycol. Med.* 22, 42–51. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2011.12.077>
- Arifuzzaman, M., Khatun, M.S., Rahman, H., 2010. Isolation and screening of actinomycetes from Sundarbans soil for antibacterial activity. *African J. Biotechnol.* 9, 4615–4619.
- Bååth, E., 1996. Adaptation of soil bacterial communities to prevailing pH in different soils. *FEMS Microbiol. Ecol.* 19, 227–237. [https://doi.org/10.1016/0168-6496\(96\)00008-6](https://doi.org/10.1016/0168-6496(96)00008-6)
- Babalola, O.O., Kirby, B.M., Le Roes-Hill, M., Cook, A.E., Cary, S.C., Burton, S.G., Cowan, D.A., 2009. Phylogenetic analysis of actinobacterial populations associated with Antarctic Dry Valley mineral soils. *Environ. Microbiol.* 11, 566–576. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2008.01809.x>
- Badji, B., Riba, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2005. Activité antifongique d'une souche d'*Actinomadura* d'origine saharienne sur divers champignons pathogènes et toxigènes. *J. Mycol. Med.* 15, 211–219.

## Références bibliographiques

- <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2005.07.001>
- Badji, B., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N., 2006. Antimicrobial compounds produced by *Actinomadura* sp. AC104 isolated from an Algerian Saharan soil. *Can. J. Microbiol.* 52, 373–382. <https://doi.org/10.1139/W05-132>
- Bahorun, T., Gressier, B., Trotin, F., Brunet, C., Dine, T., Luyckx, M., Vasseur, J., Cazin, M., Cazin, J.C., Pinkas, M., 1996. Oxygen species scavenging activity of phenolic extracts from hawthorn fresh plant organs and pharmaceutical preparations. *Arzneimittelforschung.* 46, 1086–1089.
- Balasundram, N., Sundram, K., Samman, S., 2006. Phenolic compounds in plants and agricultural by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chem.* 99, 191–203.
- Baltz, R.H., 2010. Genomics and the ancient origins of the daptomycin biosynthetic gene cluster. *J. Antibiot. (Tokyo).* 63, 506–511.
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016a. Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, 1–43. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00044-16>
- Barka, E.A., Vatsa, P., Sanchez, L., Gaveau-Vaillant, N., Jacquard, C., Meier-Kolthoff, J.P., Klenk, H.-P., Clément, C., Ouhdouch, Y., van Wezel, G.P., 2016b. Correction for Barka et al., Taxonomy, Physiology, and Natural Products of Actinobacteria. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 80, iii–iii. <https://doi.org/10.1128/mmbr.00044-16>
- Basilio, A., González, I., Vicente, M.F., Gorrochategui, J., Cabello, A., González, A., Genilloud, O., 2003. Patterns of antimicrobial activities from soil actinomycetes isolated under different conditions of pH and salinity. *J. Appl. Microbiol.* 95, 814–823. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2003.02049.x>
- Bastide, A., de Méo, M., Andriantsoa, M., Laget, M., Duménil, G., 1986. Isolement et sélection de souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques de structure non-polyénique. *MIRCEN J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2, 453–466. <https://doi.org/10.1007/BF00933368>
- BECKER, B., LECHEVALIER, M.P., GORDON, R.E., LECHEVALIER, H.A., 1964. Rapid Differentiation Between *Nocardia* and *Streptomyces* By Paper. *Appl. Microbiol.* 12, 421–423. <https://doi.org/10.1128/aem.12.5.421-423.1964>
- Behroozian, S., Svensson, S.L., Davies, J., 2016. Kisameet clay exhibits potent antibacterial activity against the ESKAPE pathogens. *MBio* 7, 1–4. <https://doi.org/10.1128/mBio.01842-15>
- Belyagoubi, L., 2014. Antibiotiques produits par des bactéries (Actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels algériens 2013–2014.
- Bensadón, S., Hervert-Hernández, D., Sáyago-Ayerdi, S.G., Goñi, I., 2010. By-Products of *Opuntia ficus-indica* as a Source of Antioxidant Dietary Fiber. *Plant Foods Hum. Nutr.* 65, 210–216. <https://doi.org/10.1007/s11130-010-0176-2>
- Bentley, S.D., Chater, K.F., Cerdeño-Tárraga, A.-M., Challis, G.L., Thomson, N.R., James, K.D., Harris, D.E., Quail, M.A., Kieser, H., Harper, D., others, 2002. Complete genome sequence of the model actinomycete *Streptomyces coelicolor* A3 (2). *Nature* 417, 141–147.
- Bibb, M., Hesketh, A., 2009. Chapter 4 Analyzing the Regulation of Antibiotic Production in Streptomycetes, 1st ed, *Methods in Enzymology*. Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(09\)04804-6](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)04804-6)
- Bieber, L.W., Da Silva Filho, A.A., Silva, E.C., De Mello, J.F., Lyra, F.D.A., Do Nascimento, M.S., Botta, B., De Angelis, F., 1989. The anthracycline complex retamycin, 1. structure determination of the major constituents. *J. Nat. Prod.* 52, 385–

## Références bibliographiques

388. <https://doi.org/10.1021/np50062a029>
- Blois, M., 1965. Antioxidant Determinations by the Use of a Stable Free Radical. *Nature* 181, 1199–1200. <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1038/1811199a0>
- Bongarzone, S., Bolognesi, M.L., 2011. The concept of privileged structures in rational drug design: focus on acridine and quinoline scaffolds in neurodegenerative and protozoan diseases. *Expert Opin. Drug Discov.* 6, 251–268. <https://doi.org/10.1517/17460441.2011.550914>
- Bouaziz, S., Messis, A., Bettache, A., Didi, M., El, O., Benallaoua, E.S., Zone, S., Ouargla, M., 2016. Antifungal activity of *Streptomyces* sp.14 strain isolated from Ouargla (Southeast of Algeria): identification, production and characterization of the active substance. *Int. J. Biosci.* 9, 45–56. <https://doi.org/10.12692/ijb/9.5.45-56>
- Boughachiche, F., Reghioia, S., Zerizer, H., Boulahrouf, A., 2012. Activité antibactérienne d'espèces rares de *Streptomyces* contre des isolats cliniques multirésistants. *Ann. Biol. Clin. (Paris)*. 70, 169–174. <https://doi.org/10.1684/abc.2012.0661>
- Breton, A., Theilleux, J., Sanglier, J, V., 1989. Organismes producteurs : biologie, taxonomie et écologie in biotechnologie des antibiotiques.
- Burja, A.M., Banaigs, B., Abou-Mansour, E., Grant Burgess, J., Wright, P.C., 2001. Marine cyanobacteria—a prolific source of natural products. *Tetrahedron* 57, 9347–9377. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020\(01\)00931-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0040-4020(01)00931-0)
- Busscher, G.F., Rutjes, F.P.J.T., Van Delft, F.L., 2005. 2-Deoxystreptamine: central scaffold of aminoglycoside antibiotics. *Chem. Rev.* 105, 775–792.
- Butler, M.S., Hansford, K.A., Blaskovich, M.A.T., Halai, R., Cooper, M.A., 2014. Glycopeptide antibiotics: back to the future. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 67, 631–644.
- Casadevall, A., Rosas, A.L., Nosanchuk, J.D., 2000. Melanin and virulence in *Cryptococcus neoformans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 3, 354–358. [https://doi.org/10.1016/S1369-5274\(00\)00103-X](https://doi.org/10.1016/S1369-5274(00)00103-X)
- Cassini, A., Högberg, L.D., Plachouras, D., Quattrocchi, A., Hoxha, A., Simonsen, G.S., Colomb-Cotinat, M., Kretzschmar, M.E.E., Devleeschauwer, B., Cecchini, M., Ouakrim, D.A., 2019. Attributable deaths and disability-adjusted life-years caused by infections with antibiotic-resistant bacteria in the EU and the European Economic Area in 2015: a population-level modelling analysis. *Lancet. Infect. Dis.* 19, 56–66.
- Chakraborty, B., Kumar, R.S., Almansour, A.I., Perumal, K., Nayaka, S., Brindhadevi, K., 2022. *Streptomyces* filamentosus strain KS17 isolated from microbiologically unexplored marine ecosystems exhibited a broad spectrum of antimicrobial activity against human pathogens. *Process Biochem.* 117, 42–52. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.procbio.2022.03.010>
- Charlop-Powers, Z., Owen, J.G., Reddy, B.V.B., Ternei, M.A., Guimarães, D.O., de Frias, U.A., Pupo, M.T., Seepe, P., Feng, Z., Brady, S.F., 2015. Global biogeographic sampling of bacterial secondary metabolism. *Elife* 4.
- Chassagne, F., Cabanac, G., Hubert, G., David, B., Marti, G., 2019. The landscape of natural product diversity and their pharmacological relevance from a focus on the Dictionary of Natural Products ®. *Phytochem. Rev.* 18, 601–622. <https://doi.org/10.1007/s11101-019-09606-2>
- Chater, K.F., 2016. Recent advances in understanding *Streptomyces*. *F1000Research* 5.
- Cheng, C., Othman, E.M., Reimer, A., Grüne, M., Kozjak-Pavlovic, V., Stopper, H., Hentschel, U., Abdelmohsen, U.R., 2016. Ageloline A, new antioxidant and antichlamydial quinolone from the marine sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp. SBT345. *Tetrahedron Lett.* 57, 2786–2789.
- Cheng, C., Othman, E.M., Stopper, H., Edrada-Ebel, R.A., Hentschel, U., Abdelmohsen, U.R., 2017. Isolation of petrocidin a, a new cytotoxic cyclic dipeptide from the marine



## Références bibliographiques

- sponge-derived bacterium *Streptomyces* sp. SBT348. *Mar. Drugs* 15. <https://doi.org/10.3390/md15120383>
- Coates, A.R.M., Halls, G., Hu, Y., 2011. Novel classes of antibiotics or more of the same? *Br. J. Pharmacol.* 163.
- Collins, M.D., Goodfellow, M., Minnikin, D.E., 1982. Polar lipid composition in the classification of *Arthrobacter* and *Microbacterium*. *FEMS Microbiol. Lett.* 15, 299–302. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1982.tb00238.x>
- Courvalin, P., 2008. La résistance des bactéries aux antibiotiques : combinaisons de mécanismes biochimiques et génétiques. *Bull. Acad. Vet. Fr.* 161, 7–12. <https://doi.org/10.4267/2042/47917>
- Cox, P.W., Paul, G.C., Thomas, C.R., 1998. Image analysis of the morphology of filamentous micro-organisms. *Microbiology* 144 ( Pt 4, 817–827.
- Dadachova, E., Bryan, R.A., Huang, X., Moadel, T., Schweitzer, A.D., Aisen, P., Nosanchuk, J.D., Casadevall, A., 2007. Ionizing radiation changes the electronic properties of melanin and enhances the growth of melanized fungi. *PLoS One* 2. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000457>
- Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H.K., Thakur, D., 2018a. Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC Microbiol.* 18, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1215-7>
- Das, R., Romi, W., Das, R., Sharma, H.K., Thakur, D., 2018b. Antimicrobial potentiality of actinobacteria isolated from two microbiologically unexplored forest ecosystems of Northeast India. *BMC Microbiol.* 18. <https://doi.org/10.1186/s12866-018-1215-7>
- Dastager, S.G., Li, W.J., Dayanand, A., Tang, S.K., Tian, X.P., Zhi, X.Y., Xu, L.H., Jiang, C.L., 2006. Separation, identification and analysis of pigment (melanin) production in *Streptomyces*. *African J. Biotechnol.* 5, 1131–1134. <https://doi.org/10.4314/ajb.v5i11.42994>
- Davet, P., 1996a. Vie microbienne du sol et production végétale. Editions Quae.
- Davet, P., 1996b. Soil microbial life and plant production végétale. Editions Quae.
- Davies, J.E., Davies, D.K., 2010. Origins and Evolution of Antibiotic Resistance. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 74, 417–433.
- De Goncalves, R.C.R., Pombeiro-Sponchiado, S.R., 2005. Antioxidant activity of the melanin pigment extracted from *Aspergillus nidulans*. *Biol. Pharm. Bull.* 28, 1129–1131. <https://doi.org/10.1248/bpb.28.1129>
- de Lima Procópio, R.E., da Silva, I.R., Martins, M.K., de Azevedo, J.L., de Araújo, J.M., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J. Infect. Dis.* 16, 466–471. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- DeJong, P.J., 1972. L-Asparaginase production by *Streptomyces griseus*. *Appl. Microbiol.* 23 6, 1163–1164.
- Dhanasekaran, D., Thajuddin, N., Panneerselvam, A., 2009. Distribution and Ecobiology of Antagonistic *Streptomyces* From Agriculture and Coastal Soil in Tamil Nadu , India. *J. Cult. Collect.* 6, 10–20.
- Dubreuil, L., Goldstein, F., Jarlier, V., Morel, C., Philippon, A., Rouveix, B., Sirot, J., Soussy, C., Thabaut, A., 2020. Comité de l'antibiogramme de la Société Française de Microbiologie. *Société Française Microbiol.* 1.1, 181.
- Dynamique, J.L., Génomique, S., 2020. Dynamique des génomes du genre *Streptomyces* To cite this version : Dynamique des génomes du genre *Streptomyces* Jean-Noël LORENZI Thèse de doctorat.
- Dyson, P., 2011. *Streptomyces: molecular biology and biotechnology*. Horizon Scientific Press.
- Edwards, C., 1993. Isolation properties and potential applications of thermophilic

## Références bibliographiques

- actinomycetes. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 42, 161–179.
- EL-Kamali, H.H., Hassan, H.I., EL-Kheir, M.S.M., 2017. Effect of Soil Physico-Chemical Properties and Plant Species on Bacterial Diversity in Semi-Arid Parts in Central Sudan. Part III: AL-Gaeli Region, Khartoun North. *OALib* 04, 1–11. <https://doi.org/10.4236/oalib.1103337>
- El-Obeid, A., Al-Harbi, S., Al-Jomah, N., Hassib, A., 2006. Herbal melanin modulates tumor necrosis factor alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin 6 (IL-6) and vascular endothelial growth factor (VEGF) production. *Phytomedicine* 13, 324–333. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2005.03.007>
- Fallah-Tafti, A., Foroumadi, A., Tiwari, R., Shirazi, A.N., Hangauer, D.G., Bu, Y., Akbarzadeh, T., Parang, K., Shafiee, A., 2011. Thiazolyl N-benzyl-substituted acetamide derivatives: Synthesis, Src kinase inhibitory and anticancer activities. *Eur. J. Med. Chem.* 46, 4853–4858. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.050>
- Fan, L., Zheng, J., Yang, X., others, 2010. The effect of natural air-dry time on actinomycetes isolation from sample soil. *J. Hainan Med. Coll.* 16, 280–284.
- Feoktistova, M., Geserick, P., Leverkus, M., 2016. Crystal violet assay for determining viability of cultured cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* 2016, 343–346. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087379>
- Floris, B., Galloni, P., Conte, V., Sabuzi, F., 2021. Tailored functionalization of natural phenols to improve biological activity. *Biomolecules* 11. <https://doi.org/10.3390/biom11091325>
- Gallay, A., Bouyssou-Michel, A., Lassau, F., Basselier, B., Sednaoui, P., Saint-Louis, H.E., 2008. Les infections à *Neisseria gonorrhoeae* en France en 2006 : progression importante chez les femmes et augmentation persistante des résistances à la ciprofloxacine.
- Gamir, J., Pastor, V., Cerezo, M., Flors, V., 2012. Identification of indole-3-carboxylic acid[1] J. Gamir, V. Pastor, M. Cerezo, V. Flors, Identification of indole-3-carboxylic acid as mediator of priming against *Plectosphaerella cucumerina*, *Plant Physiol. Biochem.* 61 (2012) 169–179. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2012.10.004>
- Ganesan, P., Reegan, A.D., David, R.H.A., Gandhi, M.R., Paulraj, M.G., Al-Dhabi, N.A., Ignacimuthu, S., 2017. Antimicrobial activity of some actinomycetes from Western Ghats of Tamil Nadu, India. *Alexandria J. Med.* 53, 101–110. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2016.03.004>
- Gaynor, M., Mankin, A.S., 2003. Macrolide antibiotics: binding site, mechanism of action, resistance. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 949–960.
- Ghanem, N.B., Sabry, S.A., El-Sherif, Z.M., Abu El-Ela, G.A., 2000. Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 46, 105–111. <https://doi.org/10.2323/jgam.46.105>
- Gil, S.V., Pastor, S., March, G.J., 2009. Quantitative isolation of biocontrol agents *Trichoderma* spp., *Gliocladium* spp. and actinomycetes from soil with culture media. *Microbiol. Res.* 164 2, 196–205.
- Goodfellow, M., Williams, S.T., 1983. Ecology of actinomycetes. *Annu. Rev. Microbiol.* 37, 189–216.
- Grund, E., Kroppenstedt, R.M., 1990. Chemotaxonomy and numerical taxonomy of the genus *Nocardiosis* Meyer 1976. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 40, 5–11.
- Guarnaccia, V., Crous, P.W., 2017. Emerging citrus diseases in Europe caused by species of *Diaporthe*. *IMA Fungus* 8, 317–334.
- Guo, Y., Song, G., Sun, M., Wang, J., Wang, Y., 2020. Prevalence and Therapies of Antibiotic-Resistance in *Staphylococcus aureus*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 10, 1–11.

## Références bibliographiques

- <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.00107>
- Gürsoy, E., Güzeldemirci, N.U., 2007. Synthesis and primary cytotoxicity evaluation of new imidazo[2,1-b]thiazole derivatives. *Eur. J. Med. Chem.* 42, 320–326. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2006.10.012>
- Haas, D., Sylvie, L., 2015. Métabolisme secondaire de *Streptomyces ambofaciens* : exploration génomique et étude du groupe de gènes dirigeant la synthèse du sphydrofurane. [Http://Www.Theses.Fr](http://www.theses.fr).
- Hameed, I.H., Hussein, H.M., Ubaid, J.M., 2016. Determination of bioactive chemical composition of *Callosobruchus maculatus* and investigation of its anti-fungal activity. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8, 1293–1299.
- Han, Y., Xu, Q., Hu, J.N., Han, X.Y., Li, W., Zhao, L.C., 2015. Maltol, a food flavoring agent, attenuates acute alcohol-induced oxidative damage in mice. *Nutrients* 7, 682–696. <https://doi.org/10.3390/nu7010682>
- Harir, M., 2018. Caractérisation des molécules bioactives produites par des souches d'actinobactériés isolées des sols arides et semi arides 1–221.
- Hashim, A., Ismail, S.I., Alsultan, W., Seman, I.A., Rashed, O., Ahmad, K., 2020. Control of gray mold disease of tomato caused by *botrytis cinerea* using bacterial secondary metabolites. *Malaysian Appl. Biol.* 49, 89–97. <https://doi.org/10.55230/mabjournal.v49i5.1641>
- Hei, Y., Zhang, H., Tan, N., Zhou, Y., Wei, X., Hu, C., Liu, Y., Wang, L., Qi, J., Gao, J.M., 2021. Antimicrobial activity and biosynthetic potential of cultivable actinomycetes associated with Lichen symbiosis from Qinghai-Tibet Plateau. *Microbiol. Res.* 244, 126652. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126652>
- Hopwood, D., 2007. An introduction to the actinobacteria. *Microbiol. Today* 34, 60–62.
- Hosoya, Y., Adachi, H., Nakamura, H., Nishimura, Y., Naganawa, H., Okami, Y., Takeuchi, T., 1996. The structure of diphenazithionin, a novel antioxidant from *Streptomyces griseus* ISP 5236. *Tetrahedron Lett.* 37, 9227–9228.
- Hozzein, W.N., Goodfellow, M., 2011. *Actinopolyspora egyptensis* sp. nov., a new halophilic actinomycete. *African J. Microbiol. Res.* 5, 100–105.
- Hui, M.L.-Y., Tan, L.T.-H., Letchumanan, V., He, Y.-W., Fang, C.-M., Chan, K.-G., Law, J.W.-F., Lee, L.-H., 2021. The extremophilic actinobacteria: From microbes to medicine. *Antibiotics* 10, 682.
- Humphreys, H., 2012. *Staphylococcus aureus*: the enduring pathogen in surgery. *Surg.* 10, 357–360.
- Hwang, B.K., Lim, S.W., Kim, B.S., Lee, J.Y., Moon, S.S., 2001. Isolation and in Vivo and in Vitro Antifungal Activity of Phenylacetic Acid and Sodium Phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 3739–3745. <https://doi.org/10.1128/AEM.67.8.3739-3745.2001>
- Iwai, Y., Omura, S., 1982. Culture conditions for screening of new antibiotics. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 35, 123–141.
- Jaouad, M., Moinina, A., Ezrari, S., Lahlali, R., 2020. Key pests and diseases of citrus trees with emphasis on root rot diseases: An overview.
- Jensen, S.E., Paradkar, A.S., 1999. Biosynthesis and molecular genetics of clavulanic acid. *Antonie Van Leeuwenhoek* 75, 125–133.
- Johnston, N.J., Mukhtar, T.A., Wright, G.D., 2002. Streptogramin antibiotics: mode of action and resistance. *Curr. Drug Targets* 3, 335–344.
- Jongrungruangchok, S., Tanasupawat, S., Kitakoop, P., Bavovada, R., Kobayashi, H., Kudo, T., 2006. Identification of *Streptomyces* and *Kitasatospora* strains from Thai soils with geldanamycin production strain. *Actinomycetologica* 20, 10–14. <https://doi.org/10.3209/saj.20.10>

## Références bibliographiques

- Jose, P.A., Maharshi, A., Jha, B., 2021. Actinobacteria in natural products research: Progress and prospects. *Microbiol. Res.* 246. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2021.126708>
- Juvonen, T., 1998. Milloin laskevan aortan aneurysmat pitäisi leikata?, *Duodecim.*
- Kang, Q., Shen, Y., Bai, L., 2012. Biosynthesis of 3, 5-AHBA-derived natural products. *Nat. Prod. Rep.* 29, 243–263.
- Kang, S.H., Kim, Y.S., Kim, E.K., Hwang, J.W., Jeong, J.H., Dong, X., Lee, J.W., Moon, S.H., Jeon, B.T., Park, P.J., 2015. Anticancer effect of thymol on AGS human gastric carcinoma cells. *J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 28–37. <https://doi.org/10.4014/jmb.1506.06073>
- Kato, S., Kawai, H., Kawasaki, T., Toda, Y., Urata, T., Hayakawa, Y., 1989. Studies on Free Radical Scavenging Substances from Microorganisms I. Carazostatin, a New Free Radical Scavenger Produced by *Streptomyces Chromofuscus* DC 118. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 42, 1879–1881. <https://doi.org/10.7164/antibiotics.42.1879>
- Kekuda, P., Onkarappa, R., Jayanna, N., 2015. Characterization and Antibacterial Activity of a Glycoside Antibiotic from *Streptomyces variabilis* PO-178. *Sci. Technol. Arts Res. J.* 3, 116. <https://doi.org/10.4314/star.v3i4.17>
- Kekuda, T.R.P., Shobha, K.S., Onkarappa, R., 2015. Fascinating diversity and Potent biological activities of Actinomycete metabolites. *J. Pharm. Res.* 250–256.
- Keri, R.S., Patil, S.A., 2014. Quinoline: A promising antitubercular target. *Biomed. Pharmacother.* 68, 1161–1175. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2014.10.007>
- Khadayat, K., Sherpa, D.D., Malla, K.P., Shrestha, S., Rana, N., Marasini, B.P., Khanal, S., Rayamajhee, B., Bhattarai, B.R., Parajuli, N., 2020. Molecular identification and antimicrobial potential of *Streptomyces* species from Nepalese soil. *Int. J. Microbiol.* 2020.
- Khan, S.T., Komaki, H., Motohashi, K., Kozone, I., Mukai, A., Takagi, M., Shin-ya, K., 2011. *Streptomyces* associated with a marine sponge *Haliclona* sp.; biosynthetic genes for secondary metabolites and products. *Environ. Microbiol.* 13, 391–403.
- Kharel, M.K., Pahari, P., Shepherd, M.D., Tibrewal, N., Nybo, S.E., Shaaban, K.A., Rohr, J., 2012. Angucyclines: Biosynthesis, mode-of-action, new natural products, and synthesis. *Nat. Prod. Rep.* 29, 264–325.
- Kilkkinen, A., Pietinen, P., Klaukka, T., Virtamo, J., Korhonen, P., Adlercreutz, H., 2002. Use of oral antimicrobials decreases serum enterolactone concentration. *Am. J. Epidemiol.* 155, 472–477. <https://doi.org/10.1093/aje/155.5.472>
- Kim, Y., Cho, J.Y., Kuk, J.H., Moon, J.H., Cho, J. Il, Kim, Y.C., Park, K.H., 2004. Identification and Antimicrobial Activity of Phenylacetic Acid Produced by *Bacillus licheniformis* Isolated from Fermented Soybean, Chungkook-Jang. *Curr. Microbiol.* 48, 312–317. <https://doi.org/10.1007/s00284-003-4193-3>
- Kirby, R., 2011. Chromosome diversity and similarity within the Actinomycetales. *FEMS Microbiol. Lett.* 319, 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02242.x>
- Kitouni, M., Boudemagh, A., Oulmi, L., Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Hamdiken, H., Couble, A., Mouniee, D., Boulahrouf, A., Boiron, P., 2005. Isolation of actinomycetes producing bioactive substances from water, soil and tree bark samples of the north-east of Algeria. *J. Mycol. Med.* 15, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2004.12.005>
- Kominek, L.A., 1975. Cycloheximide production by *Streptomyces griseus*: control mechanisms of cycloheximide biosynthesis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7, 856–860.
- Kumar, P., Chauhan, A., Kumar, M., Kuanr, B.K., Kundu, A., Solanki, R., Kapur, M.K., 2021. In vitro and in silico anticancer potential analysis of *Streptomyces* sp. extract against human lung cancer cell line, A549. *3 Biotech* 11, 1–12.
- Kumar, P., Kamle, M., Misra, A.K., O'Donovan, A., Pagano, M., Modi, D.R., 2016.

## Références bibliographiques

- Identification and characterization of *Fusarium mangiferae* as pathogen of mango malformation in India. *Brazilian Arch. Biol. Technol.* 59, 1–9. <https://doi.org/10.1590/1678-4324-2016160280>
- Kumar, P.K.; S.A.; S. J.; K.B.; P.V.; M.R., 2021. Classification des feuilles de mangue infectées par l'antracnose, une maladie fongique l'aide de l'apprentissage en profondeur, in: 2021 5e Conference Internationale Sur Les Methodologies Informatiques et La Communication (ICCMC). pp. 1723–1729. <https://doi.org/10.1109/ICCMC51019.2021.9418383>
- Kumar, S., Ritika, 2020. A brief review of the biological potential of indole derivatives. *Futur. J. Pharm. Sci.* 6. <https://doi.org/10.1186/s43094-020-00141-y>
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., Tamura, K., 2018. MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35, 1547–1549. <https://doi.org/10.1093/molbev/msy096>
- Kumaran, S., Bharathi, selvaraj, Uttra, V., Thirunavukkarasu, R., Nainangu, P., Gopi Krishnan, V., Renuga, P.S., Wilson, A., Balaraman, D., 2020. Bioactive metabolites produced from *Streptomyces enissocaesilis* SSASC10 against fish pathogens. *Biocatal. Agric. Biotechnol.* 29, 101802. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101802>
- Kunwar, A., Priyadarsini, K., 2011. Free radicals, oxidative stress and importance of antioxidants in human health. *J. Med. Allied Sci.* 1, 53–60.
- Labeda, D.P., Goodfellow, M., Brown, R., Ward, A.C., Lanoot, B., Vannanneyt, M., Swings, J., Kim, S.B., Liu, Z., Chun, J., Tamura, T., Oguchi, A., Kikuchi, T., Kikuchi, H., Nishii, T., Tsuji, K., Yamaguchi, Y., Tase, A., Takahashi, M., Sakane, T., Suzuki, K.I., Hatano, K., 2012. Phylogenetic study of the species within the family Streptomycetaceae. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 101, 73–104. <https://doi.org/10.1007/s10482-011-9656-0>
- Latha, S., Dhanasekaran, D., 2013. Antibacterial and extracellular enzyme activities of gut actinobacteria isolated from *Gallus gallus domesticus* and *Capra hircus*. *J. Chem. Pharm. Res.* 5, 379–385.
- Latha, S., Vinothini, G., Calvin, D.J.D., Dhanasekaran, D., 2016. In vitro probiotic profile based selection of indigenous actinobacterial probiont *Streptomyces* sp. JD9 for enhanced broiler production. *J. Biosci. Bioeng.* 121 1, 124–131.
- Law, J.W.F., Chan, K.G., He, Y.W., Khan, T.M., Ab Mutalib, N.S., Goh, B.H., Lee, L.H., 2019. Diversity of *Streptomyces* spp. from mangrove forest of Sarawak (Malaysia) and screening of their antioxidant and cytotoxic activities. *Sci. Rep.* 9, 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51622-x>
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H., 1985. Biology of Actinomycetes Not Belonging to the Genus *Streptomyces*, *Biology of Industrial Microorganisms*.
- Lechevalier, H., Lechevalier, M.P., 1965. Classification des actinomycètes aérobie basé sur leur morphologie et leur composition chimique, in: *Annales de L Institut Pasteur*. p. 662–+.
- Lee, E.J., Hwang, K.Y., Lee, H.S., Chung, N., 2011. Characterization of a new *Streptomyces* sp. a1022 as a potential biocontrol agent. *J. Appl. Biol. Chem.* 54, 488–493. <https://doi.org/10.3839/jksabc.2011.075>
- Lee, J.Y., Hwang, B.K., 2002. Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can. J. Microbiol.* 48, 407–417. <https://doi.org/10.1139/w02-025>
- Lewin, G.R., Carlos, C., Chevrette, M.G., Horn, H.A., McDonald, B.R., Stankey, R.J., Fox, B.G., Currie, C.R., 2016. Evolution and Ecology of Actinobacteria and Their Bioenergy Applications. *Annu. Rev. Microbiol.* 70, 235–254. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-102215-095748>
- Liras, P., 1999. Biosynthesis and molecular genetics of cephamycins. *Antonie Van*

## Références bibliographiques

- Leeuwenhoek 75, 109–124.
- Liu, H.F., Zhou, J., Liao, J., Yi, J., Ma, D., Deng, J.X., 2019. Grafted twig rot on Citrus sinensis caused by a member of the Fusarium solani species complex. *Can. J. Plant Pathol.* 42, 133–139.
- Liu, X., Ashforth, E., Ren, B., Song, F., Dai, H., Liu, M., Wang, J., Xie, Q., Zhang, L., 2010. Bioprospecting microbial natural product libraries from the marine environment for drug discovery. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 63, 415–422. <https://doi.org/10.1038/ja.2010.56>
- Lode, H.M., 2010. Safety and tolerability of commonly prescribed oral antibiotics for the treatment of respiratory tract infections. *Am. J. Med.* 123 4 Supp, S26–38.
- Lorcy, A., Dubé, È., 2018. Les enjeux des bactéries multi-résistantes à l'hôpital. Innovations technologiques, politiques publiques et expériences du personnel.
- Lowy, F.D., 1998. Staphylococcus aureus infections. *N. Engl. J. Med.* 339, 520–532.
- LSooe, N., Kim, W., Hwang, N., Lee, Y., Cho, S., Palsson, B., Cho, B.K., 2020. Thirty complete Streptomyces genome sequences for mining novel secondary metabolite biosynthetic gene clusters. *Sci. Data* 7, 1–9. <https://doi.org/10.1038/s41597-020-0395-9>
- Lü, J.M., Lin, P.H., Yao, Q., Chen, C., 2010. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: Experimental approaches and model systems. *J. Cell. Mol. Med.* 14, 840–860. <https://doi.org/10.1111/j.1582-4934.2009.00897.x>
- Macagnan, D., da Silva Romeiro, R., Pomella, A.W.V., deSouza, J.T., 2008. Production of lytic enzymes and siderophores, and inhibition of germination of basidiospores of Moniliophthora (ex Crinipellis) perniciosa by phylloplane actinomycetes. *Biol. Control* 47, 309–314.
- Macagnan, D., Romeiro, R. da S., de Souza, J.T., Pomella, A.W. V., 2006. Isolation of actinomycetes and endospore-forming bacteria from the cacao pod surface and their antagonistic activity against the witches broom and black pod pathogens. *Phytoparasitica* 34, 122–132.
- Maher, T., Kabbashi, N.A., Mirghani, M.E.S., Alam, M.Z., Daddiouaissa, D., Abdulhafiz, F., Reduan, M.F.H., Omran, J.I., Abdul Razab, M.K.A., Mohammed, A., 2021. Optimization of ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from acacia seyal gum using response surface methodology and their chemical content identification by raman, FTIR, and GC-TOFMS. *Antioxidants* 10. <https://doi.org/10.3390/antiox10101612>
- Manar IBRAHIMI, Ouhdouch, Y., Hafidi, M., Renault, J., Oudouch, Y., 2020. Extraction et caractérisation de nouveaux antibactériens produits par les actinobactéries prédatrices d'origine marine.
- Mangamuri, U., Muvva, V., Poda, S., Naragani, K., Munaganti, R.K., Chitturi, B., Yenamandra, V., 2016. Bioactive metabolites produced by Streptomyces Cheonanensis VUK-A from Coringa mangrove sediments: isolation, structure elucidation and bioactivity. *3 Biotech* 6, 1–8. <https://doi.org/10.1007/s13205-016-0398-6>
- Manteca, A., Mäder, U., Connolly, B.A., Sanchez, J., 2006. A proteomic analysis of Streptomyces coelicolor programmed cell death. *Proteomics* 6, 6008–6022. <https://doi.org/10.1002/pmic.200600147>
- Marchese, A., Orhan, I.E., Daglia, M., Barbieri, R., Di Lorenzo, A., Nabavi, S.F., Gortzi, O., Izadi, M., Nabavi, S.M., 2016. Antibacterial and antifungal activities of thymol: A brief review of the literature. *Food Chem.* 210, 402–414. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.111>
- Marimuthu, S., Karthic, C., Mostafa, A.A., Mohammed Al-Enazi, N., Abdel-Raouf, N., Nageh Sholkamy, E., 2020. Antifungal activity of Streptomyces sp. SLR03 against tea fungal plant pathogen Pestalotiopsis theae. *J. King Saud Univ. - Sci.* 32, 3258–3264. <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2020.08.027>
- Mary P. Lechevalier and Hubert Lechevalier, 1970. CHEMICAL COMPOSITION AS A

## Références bibliographiques

- CRITERION IN THE CLASSIFICATION OF AEROBIC ACTINOMYCETES. *J. Chem. Inf. Model.* 53, 1689–1699.
- Mawufemo, T.Y., Dzidzonu, N.K., Déassoua, B.L., Georges, T., Badomta, D., Majesté, W.I., 2020. Profil bacteriologique des infections urinaires chez les patients insuffisants renaux chroniques hospitalises au service de nephrologie.
- Mayfield, C.I., Williams, S.T., Ruddick, S.M., Hatfield, H.L., 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil IV. Observations on the form and growth of streptomycetes in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4, 79–91.
- MG, M., 1955. Cycloserine: an antibiotic paradox. *Antibiot. Annu.* 3, 131–135.
- Milshteyn, A., Schneider, J.S., Brady, S.F., 2014. Mining the metabiome: Identifying novel natural products from microbial communities. *Chem. Biol.* 21, 1211–1223. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2014.08.006>
- Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., Gianni, L., 2004. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* 56, 185–229.
- Morales-López, J., Centeno-Álvarez, M., Nieto-Camacho, A., López, M.G., Pérez-Hernández, E., Pérez-Hernández, N., Fernández-Martínez, E., 2016. Evaluation of antioxidant and hepatoprotective effects of white cabbage essential oil. *Pharm. Biol.* 55, 233–241. <https://doi.org/10.1080/13880209.2016.1258424>
- Muller, A., Muller, A., 2018. Bon usage des antibiotiques : résultats d'actions dans différents types d'établissements de santé To cite this version : HAL Id : tel-01842246 Par.
- Musiol, R., 2013. Quinoline-based HIV Integrase Inhibitors. *Curr. Pharm. Des.* 19, 1835–1849. <https://doi.org/10.2174/1381612811319100008>
- Nahar, L., Russell, W.R., Middleton, M., Shoeb, M., Sarker, S.D., 2005. Antioxidant phenylacetic acid derivatives from the seeds of *Ilex aquifolium*. *Acta Pharm.* Nahar, L., Russell, W.R., Middleton, M., Shoeb, M., Sarker, S.D. *Antioxid. phenylacetic acid Deriv. from seeds Ilex aquifolium. Acta Pharm.* 55(2), 187–93. 55, 187–193.
- Narayana, K.J.P., Kumar, K.G., Vijayalakshmi, M., 2008. L-asparaginase production by *Streptomyces albidoflavus*. *Indian J. Microbiol.* 48, 331–336.
- Naveen, M., Kavitha, R., 2021. HPLC, GC–MS and FT-IR analysis of bioactive phytochemicals present in aqueous extract of leaf of *Clerodendrum phlomidis*: A further evidence for its medicinal diversity. *Mater. Today Proc.* <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2021.05.414>
- Nayaka, S., Chakraborty, B., Bhat, M.P., Nagaraja, S.K., Airodagi, D., Swamy, P.S., Rudrappa, M., Hiremath, H., Basavarajappa, D.S., Kanakannanavar, B., 2020. Biosynthesis, characterization, and in vitro assessment on cytotoxicity of actinomycete-synthesized silver nanoparticles on *Allium cepa* root tip cells. *Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci.* 9, 1–18.
- Nikaido, H., 2009. Multidrug resistance in bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* 78, 119–146.
- Ningthouja, D.S., Sanasam, S., Nimaichand, S., 2009. Screening of Actinomycete Isolates from Niche Habitats in Manipur for Antibiotic Activity. *Am. J. Biochem. Biotechnol.* 5, 221–225. <https://doi.org/10.3844/ajbbsp.2009.221.225>
- Nitiss, J.L., 2009. Targeting DNA topoisomerase II in cancer chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* 9, 338–350.
- Obeidat, M., 2017. Cytotoxicity of n-Butanol extracts of streptomycetes against human breast cancer cells. *Int. J. Pharmacol.* 13, 969–979. <https://doi.org/10.3923/ijp.2017.969.979>
- Ohnishi, Y., Ishikawa, J., Hara, H., Suzuki, H., Ikenoya, M., Ikeda, H., Yamashita, A., Hattori, M., Horinouchi, S., 2008. Genome sequence of the streptomycin-producing microorganism *Streptomyces griseus* IFO 13350. *J. Bacteriol.* 190, 4050–4060.
- Okami, Y., Hotta, K., 1988. Search and discovery of new antibiotics, Actinomycetes in

## Références bibliographiques

- biotechnology.
- Okeke, I.N., Lamikanra, A., Edelman, R.R., 1999. Socioeconomic and behavioral factors leading to acquired bacterial resistance to antibiotics in developing countries. *Emerg. Infect. Dis.* 5, 18–27.
- Orhan Puskullu, M., Tekiner, B., Suzen, S., 2013. Recent Studies of Antioxidant Quinoline Derivatives. *Mini Rev. Med. Chem.* 13, 365–372. <https://doi.org/10.2174/138955713804999793>
- Oyaizu, M., 1986. Studies on products of browning reaction. Antioxidative activities of products of browning reaction prepared from glucosamine. *Japanese J. Nutr. Diet.* 44, 307–315. <https://doi.org/10.5264/eiyogakuzashi.44.307>
- Pandey, A., Nigam, P.S., Soccol, C.R., Soccol, V.T., Singh, D., Mohan, R., 2000. Advances in microbial amylases. *Biotechnol. Appl. Biochem.* 31 ( Pt 2), 135–152.
- Pandey, A., Shukla, A., Majumdar, S.K., 2005. Utilization of carbon and nitrogen sources by *Streptomyces kanamyceticus* M 27 for the production of an anti bacterial antibiotic. *African J. Biotechnol.* 4, 909–910.
- Patzer, S.I., Braun, V., 2010. Gene cluster involved in the biosynthesis of griseobactin, a catechol-peptide siderophore of *Streptomyces* sp. ATCC 700974. *J. Bacteriol.* 192, 426–435.
- Pfefferle, C., Theobald, U., Gürtler, H., Fiedler, H.P., 2000. Improved secondary metabolite production in the genus *Streptosporangium* by optimization of the fermentation conditions. *J. Biotechnol.* 80, 135–142. [https://doi.org/10.1016/S0168-1656\(00\)00249-2](https://doi.org/10.1016/S0168-1656(00)00249-2)
- Pizzino, G., Irrera, N., Cucinotta, M., Pallio, G., Mannino, F., Arcoraci, V., Squadrito, F., Altavilla, D., Bitto, A., 2017. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8416763>
- Poehlsgaard, J., Douthwaite, S., 2003. Macrolide antibiotic interaction and resistance on the bacterial ribosome. *Curr. Opin. Investig. Drugs* 4, 140–148.
- Pozsgai, G., Payrits, M., Sághy, É., Sebestyén-Bátai, R., Steen, E., Szőke, É., Sándor, Z., Solymár, M., Garami, A., Orvos, P., Tálosi, L., Helyes, Z., Pintér, E., 2017. Analgesic effect of dimethyl trisulfide in mice is mediated by TRPA1 and sst4 receptors. *Nitric Oxide - Biol. Chem.* 65, 10–21. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2017.01.012>
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A., Willey, J.M., Sherwood, L.M., Woolverton, C.J., 2003. *Microbiologie*. 2e éd. Bruxelles.
- Priyadharsini, P., Dhanasekaran, D., Kanimozhi, B., 2013. Isolation, structural identification and herbicidal activity of N-phenylpropanamide from *Streptomyces* sp. KA1-3. *Arch. Phytopathol. Plant Prot.* 46, 364–373.
- Quinn, G.A., Banat, A.M., Abdelhameed, A.M., Banat, I.M., 2020. *Streptomyces* from traditional medicine: sources of new innovations in antibiotic discovery. *J. Med. Microbiol.* 69, 1040–1048. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.001232>
- Raharja, N.I., Widanarni, Wahyudi, A.T., 2019. Marine sponge-associated bacteria as biocontrol agents of vibriosis on whiteleg shrimp caused by *Vibrio parahaemolyticus*. *Biodiversitas* 20, 3164–3169. <https://doi.org/10.13057/biodiv/d201108>
- Rajendran, K., Sen, S., G., S., Senthil, S.L., Kumar, T.V., 2017. Evaluation of cytotoxicity of hematite nanoparticles in bacteria and human cell lines. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 157, 101–109. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2017.05.052>
- Rajivgandhi, G., Ramachandran, G., Maruthupandy, M., Vaseeharan, B., Manoharan, N., 2019. Molecular identification and structural characterization of marine endophytic actinomycetes *Nocardiopsis* sp. GRG 2 (KT 235641) and its antibacterial efficacy against isolated ESBL producing bacteria. *Microb. Pathog.* 126, 138–148.
- Ramaswamy, S. V, Musser, J.M., 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent



## Références bibliographiques

- resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: 1998 update. *Tuber. Lung Dis.* 79 1, 3–29.
- Re, R., Nicoletta, P., Anna, P., Ananth, P., Min, Y., Catherine, R.-E., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic. Biol. Med.* 26, 1231–1237.
- Reghioua, S., Boughachiche, F., Zerizer, H., Oulmi, L., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A., 2006. Activité antibactérienne d'actinomycètes rares isolés d'échantillons de sol aride du Sud-est Algérien. *Antibiotiques* 8, 147–152. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1294-5501\(06\)70814-7](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S1294-5501(06)70814-7)
- Rossi-Tamisier, M., Benamar, S., Raoult, D., Fournier, P.E., 2015. Cautionary tale of using 16s rRNA gene sequence similarity values in identification of human-associated bacterial species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 65, 1929–1934. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.000161>
- Rousk, J., Brookes, P.C., Baath, E., 2009. Contrasting soil pH effects on fungal and bacterial growth suggest functional redundancy in carbon mineralization. *Appl. Environ. Microbiol.* 75, 1589–1596.
- Rowland, I., Wiseman, H., Sanders, T., Adlercreutz, H., Bowey, E., 1999. Metabolism of oestrogens and phytoestrogens: Role of the gut microflora. *Biochem. Soc. Trans.* 27, 304–308. <https://doi.org/10.1042/bst0270304>
- Rudi Emerson de Lima Procópioa, Ingrid Reis da Silvaa, Mayra Kassawara Martinsa, João Lúcio de Azevedoa, J.M. de A., 2012. Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Brazilian J. Infect. Dis.* 16, 466–471. <https://doi.org/10.1016/j.bjid.2012.08.014>
- Sah, S.N., Lekhak, B., 2017. Screening of Antibiotic Producing Actinomycetes for Antibiosis from Soil of Siraha, Nepal. *Himal. J. Sci. Technol.* 1, 20–25. <https://doi.org/10.3126/hijost.v1i0.25817>
- Saitou, N., Nei, M., 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4, 406–425. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a040454>
- Sanjenbam, P., Kannabiran, K., 2016. sp. VITPK9 Isolated from the Salt Spring Habitat of Manipur, India 10, 265–270.
- Saudagar, P.S., Survase, S.A., Singhal, R.S., 2008. Clavulanic acid: a review. *Biotechnol. Adv.* 26, 335–351.
- Saurav, K., Kannabiran, K., 2012. Cytotoxicity and antioxidant activity of 5-(2,4-dimethylbenzyl)pyrrolidin-2-one extracted from marine *Streptomyces* VITSVK5 spp. *Saudi J. Biol. Sci.* 19, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2011.07.003>
- Sebak, M., Saafan, A.E., Abdelghani, S., Bakeer, W., Moawad, A.S., El-Gendy, A.O., 2021. Isolation and optimized production of putative antimicrobial compounds from Egyptian soil isolate *Streptomyces* sp. MS. 10. Beni-Suef Univ. J. Basic Appl. Sci. 10. <https://doi.org/10.1186/s43088-021-00099-7>
- Senghor, A., Sharma, K., Kumar, P., Bandyopadhyay, R., 2012. First Report of Mango Malformation Disease Caused by *Fusarium tuiense* in Senegal. *Plant Dis.* 96 10, 1582.
- Sengupta, S., Pramanik, A., Ghosh, A., Bhattacharyya, M., 2015. Antimicrobial activities of actinomycetes isolated from unexplored regions of Sundarbans mangrove ecosystem. *BMC Microbiol.* 15, 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12866-015-0495-4>
- Ser, H.L., Palanisamy, U.D., Yin, W.F., Abd Malek, S.N., Chan, K.G., Goh, B.H., Lee, L.H., 2015. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo[1,2-a]pyrazine-1,4-dione, hexahydro- in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Front. Microbiol.* 6, 1–11. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.00854>
- Ser, H.-L., Palanisamy, U.D., Yin, W.-F., Abd Malek, S.N., Chan, K.-G., Goh, B.-H., Lee, L.-H., 2015. Presence of antioxidative agent, Pyrrolo [1, 2-a] pyrazine-1, 4-dione, hexahydro-in newly isolated *Streptomyces mangrovisoli* sp. nov. *Front. Microbiol.* 6,

## Références bibliographiques

- 854.
- Ser, H.L., Tan, L.T.H., Palanisamy, U.D., Abd Malek, S.N., Yin, W.F., Chan, K.G., Goh, B.H., Lee, L.H., 2016. *Streptomyces antioxidans* sp. nov., a novel mangrove soil actinobacterium with antioxidative and neuroprotective potentials. *Front. Microbiol.* 7, 1–14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00899>
- Sharma, R.N., Xavier, F.P., Vasu, K.K., Chaturvedi, S.C., Pancholi, S.S., 2009. Synthesis of 4-benzyl-1, 3-thiazole derivatives as potential anti-inflammatory agents: an analogue-based drug design approach. *J. Enzyme Inhib. Med. Chem.* 24, 890–897.
- Sharma, S., Fulke, A.B., Chaubey, A., 2019. The extremophilic actinobacteria: from microbes to medicine. *Acta Oceanol. Sin.* 38, 1–17.
- Sharmin, S.A., Md.TowhidHossain, Anwar, M., 2005. Isolation and Characterization of a Protease Producing Bacteria *Bacillus amovivorus* and Optimization of Some Factors of Culture Conditions for Protease Production. *J. Biol. Sci.* 5, 358–362.
- Shin-ya, K., Tanaka, M., Furihata, K., Hayakawa, Y., Seto, H., 1993. Structure of carquinostatin A, a new neuronal cell protecting substance produced by *Streptomyces exfoliatus*. *Tetrahedron Lett.* 34, 4943–4944.
- SHIRLING, E.B., 1966. SHIRLING, E. B. et GOTTLIEB, D. Methods for characterization of *Streptomyces*, 1966, p. 313-40. 16, 340.
- Siegel, R.L., Miller, K.D., Fuchs, H.E., Jemal, A., 2022. Cancer statistics, 2022. *CA. Cancer J. Clin.* 72, 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21708>
- Silver, W.L., Neff, J., McGroddy, M., Veldkamp, E., Keller, M., Cosme, R., 2000. Effects of soil texture on belowground carbon and nutrient storage in a lowland Amazonian forest ecosystem. *Ecosystems* 3, 193–209. <https://doi.org/10.1007/s100210000019>
- Singh, A.P., Singh, R.B., Mishra, S., 2012. Microbial and biochemical aspects of antibiotic producing microorganisms from soil samples of certain industrial area of india-an overview. *Open Nutraceuticals J.* 5, 107–112. <https://doi.org/10.2174/1876396001205010107>
- Singh, L.S., Mazumder, S., Bora, T.C., 2009. Optimisation of process parameters for growth and bioactive metabolite produced by a salt-tolerant and alkaliphilic actinomycete, *Streptomyces tanashiensis* strain A2D. *J. Mycol. Med.* 19, 225–233. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2009.07.006>
- Singh, S.B., Barrett, J.F., 2006. Empirical antibacterial drug discovery--foundation in natural products. *Biochem. Pharmacol.* 71 7, 1006–1015.
- Singh, V., Haque, S., Singh, H., Verma, J., Vibha, K., Singh, R., Jawed, A., Tripathi, C.K.M., 2016. Isolation, screening, and identification of novel isolates of actinomycetes from India for antimicrobial applications. *Front. Microbiol.* 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01921>
- Smaoui, S., 2010. Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés 251.
- Stefaniak, E.A., Worobiec, A., Potgieter-Vermaak, S., Alsecz, A., Török, S., Van Grieken, R., 2006. Molecular and elemental characterisation of mineral particles by means of parallel micro-Raman spectrometry and Scanning Electron Microscopy/Energy Dispersive X-ray Analysis. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* 61, 824–830. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2006.04.009>
- Tan, L.T.H., Chan, K.G., Khan, T.M., Bukhari, S.I., Saokaew, S., Duangjai, A., Pusparajah, P., Lee, L.H., Goh, B.H., 2017. *Streptomyces* sp. MUM212 as a source of antioxidants with radical scavenging and metal chelating properties. *Front. Pharmacol.* 8, 1–18. <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00276>
- Tan, L.T.H., Ser, H.L., Yin, W.F., Chan, K.G., Lee, L.H., Goh, B.H., 2015. Investigation of antioxidative and anticancer potentials of *Streptomyces* sp. MUM256 isolated from

## Références bibliographiques

- Malaysia mangrove soil. *Front. Microbiol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01316>
- Tanaka, Y., Omura, S., 1990. Metabolism and products of actinomycetes-an introduction. *Actinomycetologica* 4, 13–14.
- Tecon, R., Or, D., 2017. Biophysical processes supporting the diversity of microbial life in soil. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 599–623. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux039>
- Tenover, F.C., 2006. Mechanisms of antimicrobial resistance in bacteria. *Am. J. Med.* 119 6 Supp, S3–10; discussion S62–70.
- Thakur, D., Yadav, A., Gogoi, B.K., Bora, T.C., 2007. Isolation and screening of *Streptomyces* in soil of protected forest areas from the states of Assam and Tripura, India, for antimicrobial metabolites. *J. Mycol. Med.* 17, 242–249. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2007.08.001>
- Thirion-Merle, V., 2016. Spectrométrie de fluorescence X To cite this version : Spectrométrie de fluorescence X 8.
- Tian, S., Yang, Y., Liu, K., Xiong, Z., Xu, L., Zhao, L., 2014. Antimicrobial metabolites from a novel halophilic actinomycete *Nocardopsis terrae* YIM 90022. *Nat. Prod. Res.* 28, 344–346. <https://doi.org/10.1080/14786419.2013.858341>
- Tsuji, K., Ishikawa, H., 1994. Synthesis and anti-pseudomonal activity of new 2-isocephems with a dihydroxypyridone moiety at C-7. *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 4, 1601–1606. [https://doi.org/10.1016/S0960-894X\(01\)80574-6](https://doi.org/10.1016/S0960-894X(01)80574-6)
- Tyagi, S., Lee, K.J., Shukla, P., Chae, J.C., 2020. Dimethyl disulfide exerts antifungal activity against *Sclerotinia minor* by damaging its membrane and induces systemic resistance in host plants. *Sci. Rep.* 10, 1–12. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63382-0>
- Ubaid, J.M., Hussein, H.M., Hameed, I.H., 2016. Determination of bioactive chemical composition of *callosobruchus maculatus* and investigation of its anti-fungal activity. *Int. J. Pharmacogn. Phytochem. Res.* 8, 1293–1299.
- Ullah, I., Arshad, M., Jamshed, M., Chuadhry, I., Noureen, U., Jadoon, W.A., 2012. Actinomycetes screening for bioactive potential isolated from the moist forest soils of Pakistan. *Rec. Zool. Surv. Pakistan* 13, 10–13.
- Vakulenko, S.B., Mobashery, S., 2003. Versatility of aminoglycosides and prospects for their future. *Clin. Microbiol. Rev.* 16, 430–450.
- Valan Arasu, M., Duraipandiyan, V., Agastian, P., Ignacimuthu, S., 2009. In vitro antimicrobial activity of *Streptomyces* spp. ERI-3 isolated from Western Ghats rock soil (India). *J. Mycol. Med.* 19, 22–28. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2008.12.002>
- Van Bambeke, F., 2006. Glycopeptides and glycodepsipeptides in clinical development: a comparative review of their antibacterial spectrum, pharmacokinetics and clinical efficacy. *Curr. Opin. Investig. drugs* 7, 740.
- van der Meij, A., Worsley, S.F., Hutchings, M.I., van Wezel, G.P., 2017. Chemical ecology of antibiotic production by actinomycetes. *FEMS Microbiol. Rev.* 41, 392–416. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux005>
- Van Hop, D., Sakiyama, Y., Binh, C.T.T., Otoguro, M., Hang, D.T., Miyadoh, S., Luong, D.T., Ando, K., 2011. Taxonomic and ecological studies of actinomycetes from Vietnam: Isolation and genus-level diversity. *J. Antibiot. (Tokyo).* 64, 599–606. <https://doi.org/10.1038/ja.2011.40>
- van Keulen, G., Jonkers, H.M., Claessen, D., Dijkhuizen, L., Wösten, H.A.B., 2003. Differentiation and Anaerobiosis in Standing Liquid Cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J. Bacteriol.* 185, 1455–1458.
- Vassallo, A., Palazzotto, E., Renzone, G., Botta, L., Faddetta, T., Scaloni, A., Puglia, A.M., Gallo, G., 2020. The *Streptomyces coelicolor* Small ORF *trpM* Stimulates Growth and Morphological Development and Exerts Opposite Effects on Actinorhodin and Calcium-Dependent Antibiotic Production. *Front. Microbiol.* 11, 1–13.

## Références bibliographiques

- <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00224>
- Ventola, C.L., 2015. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *P T* 40 4, 277–283.
- Vinarov, A.U., Robysheva, Z.N., Sidorenko, T.E., Dirina, E.N., 2002. Biotechnology of pigment melanin, in: *Proceedings of the 1st International Congress biotechnology-State of the Art and Prospects of Development*. P.
- Vining, L.C., Stuttard, C., 1995. *Genetics and biochemistry of antibiotic production*. Butterworth-Heinemann Boston:
- Waksman, S.A., Henrici, A.T., 1943. The Nomenclature and Classification of the Actinomycetes. *J. Bacteriol.* 46, 337–341.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D., 2001. How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*? *Arch. Microbiol.* 176, 386–390. <https://doi.org/10.1007/s002030100345>
- Weisburg, W.G., Barns, S.M., Pelletier, D.A., Lane, D.J., 1991. Weisburg 1991 173, 697–703.
- Willey JM, Sherwood LM, W.C., 2010. PRESCOTT / HA RLEY / KLEIN ' S MICROBIOLOGY , 7 TH EDITION 7–8.
- Willey, J.M., Van Der Donk, W.A., 2007. Lantibiotics: peptides of diverse structure and function. *Annu. Rev. Microbiol.* 61, 477–501.
- Williams, S.T., Cross, T., 1971. Chapter XI Actinomycetes. *Methods Microbiol.* 4, 295–334.
- Williams, S.T., Locci, R., Beswick, A., Kurtböke, D.I., Kuznetsov, V.D., Le Monnier, F.J., Long, P.F., Maycroft, K.A., Palma, R.A., Petrolini, B., Quaroni, S., Todd, J.I., West, M., 1993. Detection and identification of novel actinomycetes. *Res. Microbiol.* 144, 653–656. [https://doi.org/10.1016/0923-2508\(93\)90069-E](https://doi.org/10.1016/0923-2508(93)90069-E)
- Williams, S.T., Vickers, J.C., 1988. Detection of actinomycetes in the natural environment: problems and perspectives. *Biol. actinomycetes* 88, 265–270.
- Wise, R., 2002. Antimicrobial resistance: Priorities for action. *J. Antimicrob. Chemother.* 49, 585–586. <https://doi.org/10.1093/jac/49.4.585>
- Wook Kim, J., Eun Huh, J., Hun Kyung, S., Hang Kyung, K., 2004. Antimicrobial Activity of Alk(en)yl Sulfides Found in Essential Oils of Garlic and Onion. *Food Sci. Biotechnol* 13, 235–239.
- Wright, G.D., 2012. Antibiotics: A New Hope. *Chem. Biol.* 19, 3–10. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2011.10.019>
- Yan Chu, S., 1993. New developments of agricultural antibiotic pesticide. *Trans.(China)* 15, 5–12.
- Yilma, S., Cannon-Sykora, J., Samoylov, A., Lo, T., Liu, N., Brinker, C.J., Neely, W.C., Vodyanoy, V., 2007. Large-conductance cholesterol-amphotericin B channels in reconstituted lipid bilayers. *Biosens. Bioelectron.* 22, 1359–1367. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2006.06.004>
- Yip, W.K., Cheenpracha, S., Chang, L.C., Coychoke, H.O., Seow, H.F., 2010. Anti-proliferative and anti-invasive properties of a purified fraction from *Streptomyces* sp . H 7372.
- Yu, X., Zhao, M., Liu, F., Zeng, S., Hu, J., 2013. Identification of 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose-histidine Maillard reaction products. *Food Res. Int.* 51, 397–403. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.12.044>
- Zanane, C., Latrache, H., Elfazazi, K., Zahir, H., Ellouali, M., 2018. Isolation of actinomycetes from different soils of Beni Amir Morocco. *J. Mater. Environ. Sci* 9, 2994–3000.
- Zhi, X.Y., Li, W.J., Stackebrandt, E., 2009. An update of the structure and 16S rRNA gene sequence-based definition of higher ranks of the class Actinobacteria, with the proposal

## Références bibliographiques

of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 59, 589–608. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.65780-0>

Zhu, Q.Y., Holt, R.R., Lazarus, S.A., Orozco, T.J., 2002. Inhibitory effects of cocoa flavanols and procyanidin oligomers on free radical-induced erythrocyte hemolysis. *Exp. Biol. Med.* 227, 321–329.

## Annexe

### I. Milieux recommandés pour l'isolement des *Actinomycètes* :

#### 1) Milieu de Bennett

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ D-Glucose anhydre.....	10
▪ Extrait de levure.....	2
▪ Extrait de viande.....	1
▪ Peptone.....	2
▪ Agar.....	15
▪ Eau distillé.....	1L

pH : 7,02

➤ Préparation

- Porter à l'ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

#### 2) Milieu amidon extrait de levure peptone (M2)

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ Amidon.....	10
▪ Caséine.....	0,3
▪ KNO <sub>3</sub> .....	2
▪ NaCl.....	2
▪ MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,05
▪ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2
▪ CaCO <sub>3</sub> .....	0,02
▪ FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	0,01
▪ Glucose.....	1
▪ Agar.....	15
▪ Eau distillé.....	1L

pH : 7,2

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

## Annexe

### 3) Milieu GA

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ Glucose .....	10
▪ Asparagine .....	0,5
▪ K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	0,5
▪ Agar.....	18
▪ Agar .....	15
▪ Eau distillé.....	1L

pH : 6,0

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### 4) Milieu GLM

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ Glucose .....	10
▪ Extrait de levure .....	3
▪ Extrait de malt.....	3
▪ Tryptone.....	5
▪ Agar .....	15
▪ Eau distillé.....	1L

pH : 7,2

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

## II. Milieux recommandés pour tester l'activité antimicrobienne

### 1) Milieu International *Streptomyces* Project 1 (ISP1)

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

- Extrait de levure.....3
- Tryptone.....5
- Agar.....16
- Eau distillée.....1L

pH : 7,15

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### 2) Milieu International *Streptomyces* Project 2 (ISP2)

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

- Extrait de levure.....4
- Extrait de malt.....10
- Glucose .....4
- Agar.....16
- Eau distillée.....1L

pH : 6,51

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.



## Annexe

### 3) Milieu GYEA (Glucose-extrait de levure agar)

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ Extrait de levure.....	10
▪ Glucose .....	10
▪ Agar.....	16
▪ Eau distillée.....	1L

pH : 6,96

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### 4) Milieu Bennett

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ D-Glucose anhydre.....	10
▪ Extrait de levure.....	1
▪ Extrait de viande.....	1
▪ Peptone.....	2
▪ Agar.....	15
▪ Eau distillé.....	1L

pH : 7,2

➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### 5) Milieu PDA recommandé pour tester l'activité antifongique

➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ Extrait de pomme de terre .....	4
▪ Glucose .....	20
▪ Agar .....	15
▪ Eau distillée qsp .....	1L

pH : 7,5.

## Annexe

- Préparation
  - Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
  - Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### III. Milieu de culture recommandé pour tester la tolérance au Na Cl

#### 1) Milieu YEA

- Composition (en gramme par litre d'eau distillée)
  - Extrait de levure.....3
  - Peptone.....5
  - Agar .....15
  - Eau distillée qsp.....1L

pH : 7,2
- Préparation
  - Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
  - Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

### IV. Milieu recommandé pour la production de pigment mélanoïde

#### 1) Milieu ISP9

- Composition (en gramme par litre d'eau distillée)
  - (NH<sub>2</sub>) SO<sub>4</sub>.....2,64
  - KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.....2,38
  - K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>.....5,65
  - MgSO<sub>4</sub>, 7H<sub>2</sub>O.....1
  - Solution saline.....100 mL
  - Agar .....20
  - Eau distillée qsp.....1L

pH : 7,2

La solution saline est composée de :

- Composition (en gramme par 100 mL d'eau distillée)

## Annexe

▪ CuSO <sub>4</sub> , 5H <sub>2</sub> O.....	4
▪ FeSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	1,1
▪ MnCl <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O.....	7,9
▪ ZnSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O.....	1,5

### ➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 120°C pendant 20 minutes.

## V. Autres milieux utilisés dans cette étude

1) Milieu Muller Hinton Agar : Prêt à l'emploi

2) Milieu CLED : Prêt à l'emploi

## VI. Milieu recommandé pour la préparation de la galerie classique

1) Milieu kligler-hajna

NB : Ce milieu est prêt à l'emploi.

### ➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

▪ Extrait de viande de bœuf .....	3
▪ Extrait de levure.....	3
▪ Peptone .....	20
▪ Chlorure de sodium.....	5
▪ Citrate ferrique.....	0,3
▪ Thiosulfate de sodium.....	0,3
▪ Lactose.....	10
▪ Glucose.....	1
▪ Rouge de phénol.....	0,05
▪ Agar.....	12
▪ Eau distillée qsp.....	1L

pH : 7,4

## Annexe

### ➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète.
- Autoclaver à 121°C pendant 20 min.
- Laisser refroidir sur des tubes en position inclinée jusqu'à 50°C environ.

## 2) Milieu mannitol- Mobilité

NB : Ce milieu est prêt à l'emploi.

### ➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

- Hydrolysant tryptique de caséine.....10
- Nitrate de potassium.....1
- Mannitol.....7,5
- Rouge de phénol à 1 % .....0,04
- Agar .....3,5
- Eau distillée qsp.....1L

pH : 7,6 ± 0,2

### ➤ Préparation

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Autoclaver à 121°C pendant 20 min
- Laisser refroidir et répartir en tubes

## 3) Milieu citrate de simmons

NB : Ce milieu est prêt à l'emploi.

### ➤ Composition (en gramme par litre d'eau distillée)

- Sulfate de magnésium.....0,2
- Phosphate de monoammonique.....1
- Phosphate dipotassique.....1
- Citrate de sodium.....2
- Chlorure de sodium.....5

## Annexe

- Bleu de bromothymol.....0,08
- Agar .....15
- Eau distillée qsp.....1L

pH finale : 6,9

➤ Préparation :

- Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Autoclaver à 121°C pendant 15 min
- Laisser refroidir en position inclinée pour obtenir une pente de grande surface.

### 4) Milieu urée-indole

NB : Ce milieu est commercialisé.

➤ Composition (en millilitre)

- L-tryptophane.....0,3
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$ .....0,1
- $\text{K}_2\text{HPO}_4$ .....0,1
- Na Cl.....0,51
- Urée.....21
- Alcool à 95° .....1
- Rouge de phénol à 1 %.....0,251
- Eau distillée.....100