

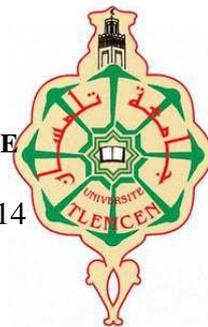


RÉPUBLIQUE ALGÉRIENNE DÉMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

N° d'ordre :

Année 2014



Université Aboubakr Belkaid-Tlemcen

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers
Département de Biologie

Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA)
Laboratoire de l'Unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes
MNHN (Paris)

THÈSE

Présentée

par **Mr. BELYAGOUBI Larbi**

Pour l'obtention d'un Doctorat en **Biologie**

Option : Substances Naturelles, Activités Biologiques et Synthèse

Antibiotiques produits par des bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) issus de différents écosystèmes naturels Algériens.

Soutenue le : Jeudi 26 Juin 2014

Devant le jury composé de :

Président :	Mr Chabane Sari D.	Professeur	Université de Tlemcen
Examineurs :	Mr Kihal M.	Professeur	Université d'Oran
	M ^{me} Zirah S.	Maître de conférences	MNHN, Paris
	M ^{me} Bekhechi C.	Maître de conférences	Université de Tlemcen
Directeur de thèse :	Mr Abdelouahid D. E.	Professeur	Université de Tlemcen
Co-directeur de thèse :	M ^{me} Rebuffat S.	Professeur	MNHN, Paris

Année universitaire : 2013-2014

Remerciements

Avant toute chose, je tiens à remercier «Allah» qui m'a donné la force et la volonté pour terminer ce modeste travail.

Les travaux présentés dans cette thèse ont été effectués au Laboratoire des Produits Naturels (LAPRONA) du département de Biologie, de la Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie, des Sciences de la Terre et de l'Univers (SNV/STU), de l'Université Abou Bakr Belkaid de Tlemcen. La grande partie de cette étude a été réalisée au sein de l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, UMR 7245 CNRS/MNHN (anciennement Chimie et Biochimie des Substances naturelles, UMR 5154) dirigée par Madame le professeur Sylvie REBUFFAT. Je tiens à lui exprimer mes sincères remerciements pour m'avoir permis d'effectuer ces travaux dans cette unité.

L'encadrement scientifique de ce travail a été assuré par Monsieur Djamel Eddine ABDELOUAHID, Professeur de microbiologie à la Faculté des SNV/STU de Tlemcen. Je tiens vivement à lui exprimer ma profonde reconnaissance et gratitude pour sa disponibilité, sa patience, sa compréhension, ses qualités humaines et ses intérêts portés pour mon sujet de recherche. Je le remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir été présent aussi souvent que possible malgré ses tâches pédagogiques. Son soutien permanent et son dynamisme m'ont permis d'avancer plus loin dans mes recherches.

Je remercie très chaleureusement ma co-directrice de thèse, Madame Sylvie REBUFFAT, professeur au MNHN, de l'unité Molécules de Communication et Adaptation des Micro-organismes, pour avoir accepté de m'accueillir au sein de son laboratoire pour réaliser des expériences dans ma thèse dans d'excellentes conditions, pour son soutien et nos conversations constructives.

Je souhaite remercier particulièrement, Madame Séverine ZIRAH, maître de conférences au MNHN, pour sa grande contribution à ces travaux de recherche, pour son aide précieuse, pour ses compétences scientifiques, pour sa confiance et ses conseils scientifiques précieux, pour son soutien et sa gentillesse, pour nos nombreuses discussions scientifiques, pour ses encouragements et sa bonne humeur.

Je tiens à remercier Monsieur le Professeur Daoudi CHABANE SARI, Directeur du laboratoire des « Produits Naturels », pour m'avoir fait l'honneur d'accepter la présidence du jury. Qu'il trouve ici mes sincères impressions de gratitude et de respect.

Mes remerciements vont aussi à Monsieur Mebrouk KIHAL, Professeur à l'Université d'Oran, d'avoir ménagé son temps pour juger et critiquer ce travail. Je suis particulièrement reconnaissant et honoré par sa participation au jury de cette thèse.

Que Madame Séverine ZIRAH, maître de conférences au MNHN, trouve ici l'expression de ma profonde reconnaissance et mes sincères remerciements, de m'avoir fait l'honneur d'être examinatrice et de participer au jury de ce travail.

Il m'est aussi agréable de remercier Madame Chahrazed BEKHECHI, maître de conférences à l'Université de Tlemcen, qu'elle trouve ici l'expression de ma gratitude pour l'attention qu'elle a bien voulu porter à ce travail, en acceptant de le juger en qualité de membre de jury.

J'exprime mes vifs remerciements également à tous les membres du Laboratoire des Travaux Publics de l'Ouest (LTPO) à Tlemcen pour leurs aides dans la réalisation des analyses pédologiques.

Je tiens à remercier très vivement tous les membres de l'unité « Molécules de Communication et Adaptation des Microorganismes », particulièrement Madame Manon VANDERVENNET pour son aide absolument indispensable en microbiologie. Mes remerciements vont également aux personnes avec qui j'ai pu collaboré notamment, mademoiselle Carine LOMBARD, Monsieur Jean PEDUZZI, Monsieur Christophe GOULARD et Monsieur Gérard GASTINE. Je tiens à remercier aussi Madame Yanyan LI pour sa compétence, son dynamisme et son encadrement dans la partie de biologie moléculaire. Je remercie sincèrement monsieur Idres MASSINISSA pour sa grande contribution à l'identification des bactéries lactiques.

Mes remerciements vont aussi à l'égard de Monsieur Hamza BOUABDALLAH Maître assistant à l'Université de Tlemcen, pour m'avoir donnée les coordonnées géographiques de nos stations d'échantillonnage.

Je remercie mes collègues et amis pour leur soutien et plus précisément Monsieur GOUZI Hicham et Monsieur MEBITIL Khalil pour leur aide et son amitié.

J'adresse encore mes remerciements à tous les membres du laboratoire de produits naturels qui contribuent par leur bonne humeur à créer un cadre de travail agréable.

Pour terminer, je dédie ce manuscrit à ma famille, tout particulièrement mes parents pour leur soutien, leur amour et leur sagesse qui m'ont permis d'aboutir au grade de Docteur en biologie et de devenir la personne que je suis. Mes pensées vont à mes frères, mes sœurs, mes oncles pour leur présence de tous les instants, leur sympathie et leur encouragement qu'ils m'ont apporté.

Un grand merci à ma femme pour sa sympathie chaleureuse, son appui inestimable et le sourire dans les moments difficiles et à mes fils pour la joie qu'ils nous procurent.

ملخص

التطور المستمر لمقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية وظهور أمراض معدية جديدة تبرر الحاجة الملحة للحصول على جزيئات جديدة مضادة للميكروبات. البيبتيدات المضادة للميكروبات هي عبارة عن جزيئات أساسية في دفاع الكائنات الحية ضد العدوان الخارجي والكائنات الحية المتنافسة.

ينطوي الهدف من هذه الدراسة تحت البحث والفحص للأكتينومييسات و بكتيريا حمض اللبنيك التي لها القدرة على تركيب المواد المضادة للميكروبات.

ولهذا فقد تم عزل مائة وثمانية سلالة من الأكتينومييسات (الجراثيم الشعاعية) من عينات التربة المأخوذة من مواقع مختلفة من تلمسان و الأغواط (غابات، وديان، واحات، جبال و سدود). قد صنفت السلالات الأكثر نشاطا عن طريق تفاعل البوليمراز السلسلي بين جنس *Streptomyces* ، الذي يعتبر أهم مصدر للمضادات الحيوية.

أيضا في إطار إستكشاف التنوع الميكروبي للمستحضرات التقليدية للألبان الجزائرية (الجبنة، الزبدة، الدهان و الكليلة) ، خضعت ما مجموعه ثمان عينات من المزارع والمناطق للتليل الميكروبيولوجية من أجل تحديد التنوعهم من بكتيريا حمض اللبنيك. عن طريق الطرق البيوكيميائية (*API50 CHL*) و البيولوجيا الجزيئية (*ARNr 16S*) ، أمكننا التعرف على عشرون سلالة و التي تنتمي إلى أجناس: *Enterococcus* (65%) ، *Leuconostoc* (21%) ، *Lactobacillus* (سلالتين) ، *Lactococcus* (سلالة) و *Weissella* (سلالة).

بعد الفحص الأولي أجري إختبار النشاط مضاد للميكروبات على سلالات الأكتينومييسات و بكتيريا حمض اللبنيك ضد البكتيريا إيجابية صبغة الجرام (*Bacillus cereus* ، *Micrococcus luteus* ، *Staphylococcus aureus*) و البكتيريا سالبة صبغة الجرام (*Listeria monocytogenes* و *Escherichia coli*) وكذلك خميرة (*Candida albicans*) بواسطة طرق الإنتشار على الأوساط المغذية.

البحث عن طريق تفاعل البوليمراز السلسلي للتركيب الحيوي للبيبتيدات لاسو من طرف سلالات *Streptomyces sp.* لم يعطي تضخيم الحمض النووي. كما أن محاولات إستخلاص البكتيريوسينات التي تنتجها بكتيريا حمض اللبنيك لم تؤدي إلى عزل البيبتيدات المضادة للميكروبات.

تشكل البكتيريا (أكتينومييسات و بكتيريا حمض اللبنيك) مصدر هائل للجزيئات المضادة للميكروبات ذات تنوع كبير. تحتوي النظم الإيكولوجية الجزائرية على مجموعة متنوعة هامة من الكائنات الحية الدقيقة التي قد يكون لها أنشطة بيولوجية.

الكلمات المفتاحية : التربة، منتجات الألبان التقليدية، الأكتينومييسات، بكتيريا حمض اللبنيك، النشاط المضاد للجراثيم، البيبتيدات المضادة للميكروبات.

Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques et l'émergence de nouvelles maladies infectieuses justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes. Les peptides antimicrobiens sont des molécules clés dans la défense des organismes vivants face aux agressions extérieures et aux compétiteurs.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et le criblage des actinomycètes et des bactéries lactiques capables de synthétiser des substances antimicrobiennes.

Pour cela, cent huit souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sol prélevés de différents sites de Tlemcen et Laghouat (forêts, oueds, oasis, montagnes et barrage). L'identification moléculaire basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S des quarante-sept souches les plus actives de différentes origines, a permis de les rattacher au genre *Streptomyces*, souches réputées être la source la plus importante d'antibiotiques.

Aussi dans le cadre de l'exploitation de la diversité microbienne de préparations laitières traditionnelles algériennes (Jben, Zebda, Dhan et klila), un total de 8 échantillons provenant de différentes fermes et régions ont fait l'objet d'une analyse microbiologique pour déterminer leur diversité en bactéries lactiques. Par des méthodes biochimiques (API50 CHL) et moléculaires (ARNr 16S), on a pu identifier 20 souches qui appartient aux genres *Enterococcus* (65%), *Leuconostoc* (21%), *Lactobacillus* (2 souches), *Lactococcus* (1 souche) et *Weissella* (1 souche).

Après un criblage initial, le test d'activité antimicrobienne a été effectué sur des souches d'actinomycètes et de bactéries lactiques contre des bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*), des bactéries à coloration de Gram négative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) et une levure (*Candida albicans*) par des méthodes de diffusion sur un agar.

Les souches actives ont montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis des microorganismes pathogènes et les diamètres des zones d'inhibition varient entre 06 et 29 mm pour les actinomycètes et entre 03 et 37 mm pour les bactéries lactiques.

La recherche par PCR des systèmes génétiques de biosynthèse des peptides lasso par des *Streptomyces sp.* n'a pas donné d'amplification d'ADN. Ainsi que des essais d'extraction de bactériocines produites par des bactéries lactiques n'ont pas abouti à l'isolement de peptides antimicrobiens.

Les bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) sont une source prodigieuse de molécules antimicrobiennes d'une grande diversité. Les écosystèmes Algériens abritent une variété intéressante de microorganismes qui peuvent avoir des activités biologiques.

Mots clés : Sol, Produits laitiers traditionnels, Actinomycètes, Bactéries lactiques, Activité antimicrobienne, Peptides antimicrobiens.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics and the emergence of new infectious diseases justifies the urgent need for new antimicrobial molecules. Antimicrobial peptides are key molecules in the defense against external aggression living and competing organisms.

The objective of this work is part of research and screening of actinomycetes and lactic acid bacteria who can synthesize antimicrobial substances.

For this, one hundred and eight strains of actinomycetes were isolated from soil samples collected from different sites in Laghouat and Tlemcen (forests, wadis, oases, mountains and dam). Molecular identification based on sequencing of the 16S rRNA gene of the forty-seven most active strains of different origins, allowed to attach to the genus *Streptomyces*, deemed to be the most important source of antibiotic strains.

Also in connection with the exploitation of the microbial diversity of traditional Algerian dairy preparations (Jben, Zebda, Dhan and Klila), a total of 8 samples from different farms and regions were subjected to microbiological analysis to determine diversity in lactic acid bacteria. By biochemical methods (API50 CHL) and molecular (16S rRNA) was able to identify 20 strains belonging to the genera *Enterococcus* (65%), *Leuconostoc* (21%), *Lactobacillus* (2 strains), *Lactococcus* (1 strain) and *Weissella* (1 strain).

After initial screening, the antimicrobial activity test was carried out on strains of lactic acid bacteria and actinomycetes against bacteria staining Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*), bacteria staining Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*) and yeast (*Candida albicans*) by methods of agar diffusion.

The active strains showed a strong inhibitory activity vis-à-vis pathogenic microorganisms and the diameters of the zones of inhibition ranged from 6 to 29 mm for the actinomycetes and between 3 and 37 for the lactic bacteria.

The search by polymerase chain reaction of genetic systems lasso peptides biosynthesis by *Streptomyces sp.* gave no amplification of DNA. As the extraction of bacteriocins produced by lactic acid bacteria have failed tests in isolation of antimicrobial peptides.

The bacteria (actinomycetes and lactic bacteria) are prodigious source of antimicrobial molecules of great diversity. Algerians ecosystems contain an interesting variety of microorganisms that may have biological activities.

Key words: Soil, Traditional dairy produce, Actinomycetes, Lactic acid bacteria, Antimicrobial activity, Lasso peptides.

Table des matières

Remerciements	i
ملخص	iii
Résumé	iv
Abstract.....	v
Table des matières	vi
Liste des figures	x
Liste des tableaux	xii
Liste des abréviations	xiv
<i>Introduction</i>	2
<i>Synthèse Bibliographique</i>	5
CHAPITRE I : Les actinomycètes	7
I. Introduction.....	7
II. Historique	9
III. Morphologie	10
IV. Écologie et distribution dans la nature	14
V. Métabolisme	17
VI. Critères d'identification	17
VII. Le genre <i>Streptomyces</i>	23
VII.1. Cycle de vie	23
VII.2. Génétique	25
VII.3 Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique.....	25
<i>VII.3.a. Antibiotiques</i>	26
<i>VII.3.b. Peptides bioactifs</i>	31
<i>VII.3.b.1. Les peptides antimicrobiens chez les êtres vivants</i>	31
<i>VII.3.b.2. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries</i>	31
<i>VII.3.b.3. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif.</i>	32
<i>VII.3.b.4. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif.</i>	32
<i>VII.3.c. Les peptides lasso</i>	33
<i>VII.3.d. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens</i>	36

Chapitre II. Les bactéries lactiques	38
I. Introduction	39
II. Habitat	39
III. Caractéristiques morphologiques et biochimiques.....	40
IV. Classification.....	41
V. Identification et typage des bactéries lactiques	44
VI. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées.....	44
VII. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques.....	45
VIII. Les bactériocines : peptides antibactériens produits par les bactéries à Gram positif selon la voie ribosomique.....	46
VIII.1. Introduction	46
VIII.2. Définition	47
VIII.3. Classification	48
<i>Les bactériocines de classe I ou lantibiotiques</i>	48
<i>Les bactériocines de classe II</i>	51
<i>Les bactériocines de classe III ou bactériolysines</i>	53
<i>Les bactériocines de classe IV</i>	53
<i>PROBLÉMATIQUE.....</i>	55
<i>MATÉRIEL et MÉTHODES</i>	56
Chapitre I. Les actinomycètes.....	58
I. Prélèvement des échantillons	58
II. Données physico-chimiques et pédologiques	61
III. Isolement, purification et conservation des actinomycètes.....	61
IV. Test d'activité antimicrobienne	62
IV.1. Méthode des cylindres d'agar	62
IV.2. Méthode des puits	63
V. Extraction et purification des molécules actives	63
V.1. Extraction des molécules actives à partir du culot	63
V.2. Extraction des molécules actives à partir du surnageant brut	64
V.3. Activité antibactérienne.....	64
V.4. Analyses chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS	65
VI. Identification de souches d'actinomycétales actives	65
VI.1. Critères morphologiques	65

VI.1.1. <i>Macromorphologie et caractères cultureux</i>	65
VI.1.2. <i>Etude micromorphologique</i>	65
VI.1.2.1. <i>Observation au faible grossissement</i>	65
VI.1.2.2. <i>Observation au fort grossissement</i>	66
VI.1.2.3. <i>Observation au microscope électronique à balayage</i>	66
VI.2. Critères physiologiques et biochimiques	67
VI.3. Caractérisation génétique des souches d'actinomycètes.....	71
VI.3.1. <i>Extraction d'ADN génomique des actinomycètes</i>	71
VI.3.2. <i>Amplification des gènes par PCR</i>	73
Chapitre II. Les Bactéries lactiques	77
I. Origine des échantillons	78
II. Préparation des produits laitiers traditionnels	80
III. Mesure du pH	81
IV. Analyses microbiologiques	81
IV.1. Dénombrement des micro-organismes revivifiables	81
IV.2. Isolement des bactéries lactiques	81
V. Conservation des souches	82
VI. Identification des bactéries lactiques	82
VI.1. Coloration de Gram	82
VI.2. Test de la catalase	83
VI.3. Etat frais	83
VI.4. Identification biochimique	83
VI.5. Techniques de biologie moléculaire	83
VI.5.1. <i>Extraction d'ADN des bactéries lactiques</i>	83
VI.5.2. <i>Quantification des acides nucléiques</i>	84
VI.5.3. <i>Amplification in vitro de fragments d'ADN</i>	85
VI.5.4. <i>Electrophorèse des fragments d'ADN</i>	85
VII. Antagonisme	86
VII.1. Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes)	86
VII.2. Antagonisme Bactéries lactiques / Bactéries pathogènes	86
VII.3. Production et purification des bactériocines	87
RÉSULTATS ET DISCUSSION	88
Chapitre I. Les actinomycètes	89
I. Caractéristiques physicochimiques des échantillons	90

II. Isolement des actinomycètes	91
III. Identification de souches d'actinomycètes.....	96
III.1. Étude morphologique	96
III.2. Micromorphologie.....	100
III.3. Étude physiologique et biochimique	101
III.4. Identification de souches d'actinomycètes à l'aide de l'ADNr 16S	108
IV. Recherche de gènes codant un peptide lasso	113
V. Recherche de molécules antibiotiques	114
V.1. Méthode des cylindres d'agar.....	117
<i>V.1.1. Test d'activité antibactérienne</i>	117
<i>V.1.2. Test d'activité antifongique</i>	117
V.2. Méthode des puits	118
V.3. Fractionnement des extraits et suivi bioguidé	122
Chapitre II. Les bactéries lactiques	127
I. Introduction	128
II. pH des produits laitiers traditionnels	128
III. Isolement des bactéries lactiques	131
IV. Identification phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées	132
IV.1. Extraction de l'ADN génomique	134
IV.2. Électrophorèse sur gel d'Agarose.....	135
IV.3. Purification de l'ADN pour le séquençage.....	136
IV.4. Séquençage des gènes	137
V. Activité antibactérienne des bactéries lactiques	139
<i>CONCLUSION GENERALE.....</i>	<i>143</i>
<i>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</i>	<i>146</i>
<i>ANNEXES</i>	<i>I</i>
<i>COMMUNICATIONS & PUBLICATIONS</i>	<i>XII</i>

Liste des figures

Figure 1 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S	8
Figure 2 : Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes	10
Figure 3 : Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre <i>Streptomyces</i>	11
Figure 4 : Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes	12
Figure 5 : Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides	13
Figure 6 : Structure typique du peptidoglycane chez les Actinobactéries	19
Figure 7 : Variabilité des chaînes peptidiques du peptidoglycane chez les actinomycètes	20
Figure 8 : Colonie et cycle biologique d'un streptomycète sur milieu solide	24
Figure 9 : Croissance apicale des hyphes du mycélium aérien et formation des septa.....	24
Figure 10 : Age d'or de la découverte des antibiotiques.....	27
Figure 11 : Représentants des trois types de peptides lasso (comportant respectivement 2, 0 ou 1 pont disulfure)	36
Figure 12 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres <i>Aerococcus</i> , <i>Bacillus</i> , <i>Listeria</i> et <i>Staphylococcus</i> d'après Axelsson (2004).....	42
Figure 13. (A) Séquence de la nisine appartenant à la classe I des bactériocines. (B) Représentation des acides aminés modifiés	49
Figure 14. Mode d'action des bactériocines.....	50
Figure 15 : Structure de la mutacine II produite par <i>Streptococcus mutans</i>	51
Figure 16 : Carte d'Algérie montrant les régions d'échantillonnage.	59
Figure 17 : Les régions d'échantillonnage des produits laitiers traditionnels.....	79
Figure 18 : Photos des échantillons des préparations lactières traditionnelles	80
Figure 19 : Photos des isollements des actinomycètes du sol des forêts sur les milieux Bennett (A) et ISP2 (B)	93
Figure 20 : Aspect du mycélium végétatif et du mycélium aérien sur milieu Bennett (A, B) et milieu Amidon –caséine (C, D).....	99
Figure 21 : Observation des souches actinomycetales après coloration de Gram	100

Figure 22 : Observation des actinomycètes par microscope électronique à balayage	101
Figure 23 : Hydrolyse de l'amidon par la souche 509	103
Figure 24 : Production de pigments mélanoides par la souche 511	103
Figure 25 : Hydrolyse de la gélatine par les souches 480 et 493	103
Figure 26 : Hydrolyse de la caséine par les souches 476 et 505	103
Figure 27 : Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur les souches actinomycétales	105
Figure 28 : AntibioGramme de la souche 480	105
Figure 29 : Positionnement des amorces utilisées sur le gène de l'ARNr 16S (chez <i>Streptomyces coelicolor</i> A3(2))	108
Figure 30 : Résultats de la PCR après visualisation du profil de migration	109
Figure 31 : Comparaison du gène 16S sur Blast de la souche 469	111
Figure 32 : Tableau des résultats de l'identification des souches 469, 471, 474, 480, 493 et 510	112
Figure 33 : Position des amorces sur le système génétique de <i>S. sviveus</i>	113
Figure 34 : Activité antimicrobienne des souches actinomycétales par la méthode des cylindres d'agar contre <i>S. aureus</i> ATCC 6538 (A) et <i>C. albicans</i> (B)	118
Figure 35 : Photos des tests d'activité antimicrobienne des actinomycètes sur les souches <i>Staphylococcus aureus</i> (A, B), <i>Micrococcus luteus</i> (C) et <i>Candida albicans</i> (D).....	119
Figure 36 : Profils LC-MS (courants ioniques totaux) des premières fractions de chromatographie d'exclusion LH20, pour chaque souche sélectionnée.....	124
Figure 37 : Profils LC-MS (courants ioniques totaux) des fractions HPLC issues des extraits de mycélium de la souche 500	125
Figure 38 : Photos des boîtes d'isolement des bactéries lactiques.....	131
Figure 39 : Profil de migration des souches (de gauche vers la droite)	136
Figure 40 : Dendrogramme de bactéries lactiques	139
Figure 41 : Photos de l'activité antibactérienne des souches isolées de bactéries lactiques sur <i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	140
Figure 42 : Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers algériens	Annexe1, II

Liste des tableaux

Tableau 1 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents	14
Tableau 2 : Habitats de certains actinomycètes	16
Tableau 3 : Principaux critères utilisés pour la taxonomie des actinomycètes.....	18
Tableau 4 : Types de paroi cellulaire définis d'après des critères chimiotaxonomiques relatifs au peptidoglycane chez les Actinobacteria	20
Tableau 5 : Profils des sucres cellulaires totaux des Actinobacteria	21
Tableau 6 : Caractéristiques chimiotaxonomiques et morphologiques des principaux groupes génériques d'actinomycètes	22
Tableau 7 : Structures et cibles cellulaires d'antibiotiques produits par des souches du genre <i>Streptomyces</i>	25
Tableau 8 : Tableau des classes de peptide lasso, de leurs structures et de leurs activités biologiques	34
Tableau 9 : Principaux genres de bactéries lactiques.....	43
Tableau 10 : Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif	48
Tableau 11: Situation géographique des stations d'échantillonnage	59
Tableau 12 : Origines et aspects des échantillons des sols prélevés.....	60
Tableau 13 : Souches utilisées dans le test d'activité antimicrobienne	62
Tableau 14 : Différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme	69
Tableau 15 : Liste des amorces utilisées pour les amplifications d'ADN par PCR au cours de l'étude – Séquence et température d'hybridation.....	74
Tableau 16 : Caractéristiques des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la recherche de gène codant un peptide lasso	76
Tableau 17: Situation géographique des stations d'échantillonnage	78
Tableau 18 : Caractéristiques des échantillons prélevés.....	79
Tableau 19: Origines des souches utilisées dans les différents tests d'antagonisme	86
Tableau 20 : Paramètres physicochimiques des échantillons de sol	90
Tableau 21 : Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique.....	91
Tableau 22: Dénombrement des actinomycètes sur les milieux sélectifs d'isolement (UFC/g)	93

Tableau 23: Nombre de souches d'actinomycètes isolées à partir des échantillons du sol....	94
Tableau 24 : Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux de quelques souches actives	97
Tableau 25 : Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales	102
Tableau 26 : Croissance des souches actinomycétales à différentes températures.....	104
Tableau 27 : Nature des échantillons déposés sur gel d'agarose (produits PCR des souches 474, 493 et 523).....	109
Tableau 28: Résultat de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar	115
Tableau 29 : Résultat des molécules de référence utilisée dans la méthode des puits.....	118
Tableau 30 : Activités antibactériennes (diamètres d'inhibition en mm) des fractions LH20 issues des souches actives de <i>Streptomyces</i> sp.....	123
Tableau 31 : Activités antibactériennes (diamètres d'inhibition en mm) des fractions HPLC issues des souches actives de <i>Streptomyces</i> sp.....	125
Tableau 32: pH et dénombrement des bactéries dans les produits laitiers traditionnels.....	129
Tableau 33: Codes et origines des bactéries lactiques isolées	132
Tableau 34 : Identification des espèces via la base de données fournie avec les galeries API 50 CHL	133
Tableau 35 : Résultats des concentrations et des rapports d'absorbance des extraits d'ADN	135
Tableau 36 : Évaluation des concentrations de l'ADN amplifié après purification	136
Tableau 37: Identification et pourcentage d'homologie des souches analysées	138
Tableau 38 : Activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées des produits laitiers traditionnels.....	141
Tableau 39 : Résultats de l'antibiogramme de certaines souches d'actinomycètes avec des diamètres de zone d'inhibition.....	Annexe 6, X
Tableau 40 : Résultats de l'identification de quelques bactéries lactiques par API 50CHL	Annexe 7, XI

Liste des abréviations

ADN :	Acide désoxyribonucléique
ARN :	Acide ribonucléique
h :	Heure
HPLC :	Chromatographie Liquide à Haute Performance (« High Performance Liquid Chromatography »)
ISP :	International <i>Streptomyces</i> Project
kDa :	Kilo Dalton
L :	Litre
LC-MS :	Chromatographie Liquide couplée à la Spectrométrie de Masse
M :	Molaire
mg :	Milligramme
min :	Minute
mL :	Millilitre
mm :	Millimètre
PCR :	Réaction de Polymérase en Chaîne
P/V :	Poids/Volume
T.S.A :	Bouillon Trypto-Caséine Soja
UFC :	Unité Formant Colonie
% :	Pourcentage
°C :	Degré Celsius
µg :	Microgramme
µL :	Microlitre

Introduction générale

De nombreux antibiotiques ont été isolés dans une variété de microorganismes et ont été employés dans beaucoup de domaines : l'industrie, l'agriculture, science vétérinaire et pharmaceutique (**Oskay et al., 2004**). Cependant, des études sont en cours pour identifier de nouveaux antibiotiques efficaces contre les mycètes et les bactéries pathogènes.

A l'heure actuelle, les problèmes de la résistance aux antibiotiques et la sensibilité des patients associée à l'incapacité de contrôler certaines maladies infectieuses ont conduit à la recherche continue de nouveaux antibiotiques, à fin de combattre les organismes résistants parfois à plusieurs antibiotiques. Pour atteindre cet objectif, de nombreuses recherches se sont orientées vers le criblage de nouvelles souches productrices d'antibiotiques.

Les actinomycètes représentent une source biologique utile d'antimicrobiens contre des mycètes et des bactéries pathogènes. Ils sont surtout réputés pour leur grande capacité à produire naturellement des antibiotiques: environ 70% des molécules actives d'origine microbienne (**Okami et Hotta, 1988**), avec des possibilités intéressantes génétiquement pour la production de 10 à 20 métabolites pour chaque souche (**Islam et al., 2009**).

Les sols d'Algérie bien que soumis à un climat aride à subhumide, montrent une biodiversité surprenante d'actinomycètes, bactéries mycéliennes à Gram positif, ubiquitaires, rencontrés sur tous les substrats naturels et jouent un rôle dans la décomposition des matériaux biologiques et dans le processus d'humification. Leur nombre dans la microflore tellurique dépend de la nature, la profondeur, le pH, l'humidité et l'aération (**Larpen et Sanglier, 1989**).

Dans le même ordre d'idée un autre groupe de bactéries s'avère intéressant; les bactéries lactiques présentent un grand intérêt dans l'industrie. Elles sont largement utilisées dans l'élaboration de produits alimentaires par des procédés de fermentations lactiques. Elles assurent non seulement des caractéristiques particulières d'arômes et de texture mais aussi une bonne sécurité alimentaire liée principalement à la production d'acides organiques (acide lactique et acide acétique), qui font baisser le pH dans le milieu, et par la synthèse de bactériocines qui renforcent cette conservation.

La plupart des produits obtenus par fermentation du lait résultent de procédés traditionnels, dont l'objectif essentiel est la conservation ou la valorisation de la matière première. En Algérie, le lait cru (chèvre, brebis ou vache) est transformé par des méthodes traditionnelles en fromage (Jben), en beurre cru (Zebda ou Dhan) ou en caséine desséchée ou fraîche (Klila) et autres produits laitiers. Ces produits se conservent bien même après une longue période à température ambiante.

Actuellement les peptides antimicrobiens, qui font partie du système immunitaire inné, sont des molécules clés dans la défense des organismes vivants face aux agressions extérieures et aux compétitions. Face au problème croissant de résistance des microorganismes aux antibiotiques conventionnels, ces peptides représentent un bon modèle pour développer de nouveaux agents antimicrobiens à action ciblée et leur utilisation en conservation alimentaire. Les bactéries sont une source prodigieuse de peptides antimicrobiens d'une grande diversité. Ils sont issus soit de la voie non ribosomique via l'action d'enzymes multifonctionnelles de haut poids moléculaire, les peptide-synthétases, soit de la voie ribosomique, avec généralement production de pré-peptide clivé par une protéase puis éventuellement sujet à des modifications post-traductionnelles pour générer le peptide actif.

Le terme bactériocine regroupe en principe tous les peptides antimicrobiens d'origine bactérienne issus de la voie ribosomique. Dans la pratique, les bactériocines désignent les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram-positif, et plus particulièrement les bactéries lactiques. Chez les bactéries à Gram-négatif, on définit les colicines (protéines thermolabiles) et les microcines (peptides de masse moléculaire inférieure à 10 kDa). Le laboratoire de "Molécules de Défense et de Communication dans les Ecosystèmes Microbiens" de l'unité de « Chimie et Biochimie des Substances Naturelles » du Muséum National d'Histoire Naturelle (UMR 5154 CNRS) sous la direction du professeur S. Rebuffat, investie depuis une dizaine d'année dans la caractérisation structurale et fonctionnelle des peptides antimicrobiens (microcines et bactériocines) (**Duquesne, 2007**).

Les régions arides d'Algérie abritent des écosystèmes originaux permettant d'isoler une variété intéressante de microorganismes. Parmi ceux-ci, figurent les oueds, courts d'eau des régions semi-désertiques, la sabkha, marécage salin des régions arides, ou encore le désert. De plus, les préparations lactières traditionnelles sont des sources de bactéries lactiques potentiellement productrices de bactériocines.

Cette contribution s'organise au tour de trois parties.

La première partie fait état des connaissances existantes sur le monde de l'infiniment petit de certaines groupes de microorganismes et de leurs capacités à produire des substances biologiquement actives. Vous y trouverez dans un premier temps les informations générales liées aux actinomycètes et aux bactéries lactiques, à leurs propriétés biologiques ainsi que sur les peptides antimicrobiens chez les êtres vivants.

La deuxième partie de ce mémoire expose l'ensemble des méthodes mises en œuvre au cours de ces travaux de thèse comprenant les techniques microbiologiques, les techniques de biologie moléculaire, les techniques de la mise en évidence de l'activité antimicrobienne des souches isolées et les techniques des essais de l'identification des molécules bioactives.

La troisième partie retrace et discute les résultats obtenus au cours de cette étude. Dans la première sous-partie, nous avons investi dans la valorisation des actinomycètes isolés à partir des écosystèmes terrestres originaux selon leur profil d'activité antimicrobienne à fin de voir leur capacité à produire de substances bioactives à structure peptidique. La deuxième sous-partie est consacrée à isoler, purifier et identifier des souches de bactéries lactiques à partir des produits laitiers traditionnels à base de lait (Zebda, Dhan, Jben et Klila), et de tester leur pouvoir antimicrobien dans le but de sélectionner des souches inhibitrices possédant un pouvoir inhibiteur contre les germes pathogènes afin de préserver la santé et l'hygiène publique.

Synthèse bibliographique

Chapitre I : Les actinomycètes

Chapitre I.

Les actinomycètes

I. Introduction

Les actinomycètes appartiennent à la classe des Actinobacteria, bactéries à Gram positif de haut coefficient de Chargaff (%GC) : généralement compris entre 60 et 75 %. Le phylum des Actinobacteria est grand et complexe (**Stackebrandt, 1997; Ventura, 2007 ; Zhi, 2009**). Il regroupe 5 ordres, 13 sous-ordres, 48 familles, et plus de 200 genres bactériens (Figure 1).

Le terme actinomycète a été historiquement introduit pour définir des bactéries filamenteuses et ramifiées (**Waksman et Henrici, 1943; Kutzner, 1981 ; Larpent et Sanglier, 1989; Holt *et al.*, 1994**), qui dans la classification actuelle des Actinobacteria appartiennent à l'ordre des actinomycétales. Les actinomycètes forment des colonies circulaires constituées d'hyphes (**Eunice et Prosser, 1983**), c'est-à-dire de filaments qui irradient par croissance centrifuge, tout autour du germe qui leur a donné naissance (**Gottlieb, 1973 ; Lechevalier et Lechevalier, 1981 ; Eunice et prosser, 1983**). Cela explique leur dénomination qui provient de deux substantifs grecs «aktino» et «mycetes» et signifie « champignons à rayons» ou « champignons rayonnant».

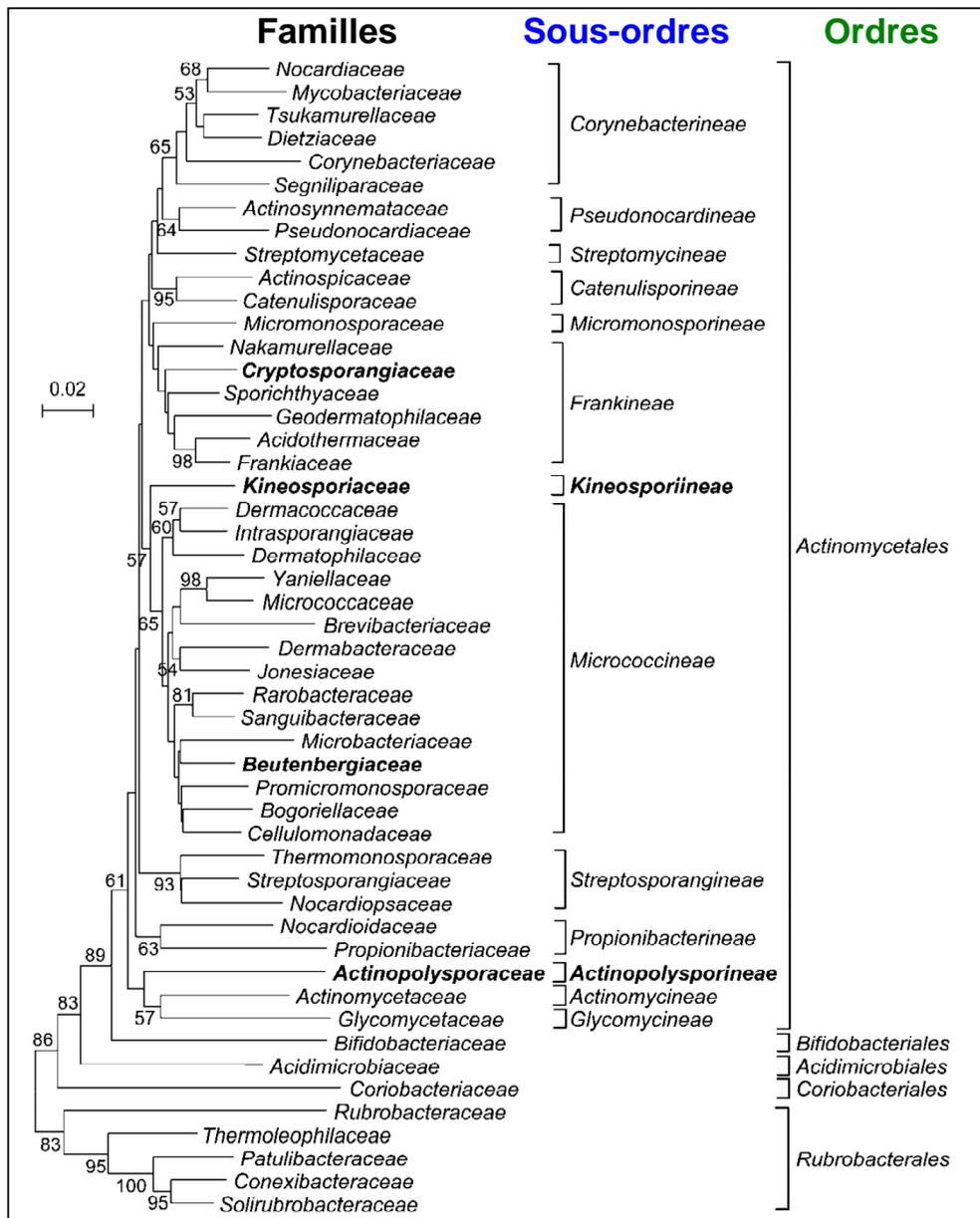


Figure 1 : Classification phylogénétique des Actinobacteria, basée sur les séquences du gène codant d'ARNr 16S (Zhi, 2009).

Les actinomycètes ont souvent été confondus avec des champignons du fait de leur morphologie fongicoïde (présence de filament ramifiés, sporulation) (Reponen *et al.*, 1998), ainsi que de l'allure mycosique des maladies que certains provoquent (Gazenko *et al.*, 1998). Toutefois, leurs propriétés chimiques, physiologiques, immunologiques les rangent sans ambiguïté parmi les procaryotes (Becker *et al.*, 1965; Lechevalier et Lechevalier, 1981). Ainsi, leur paroi cellulaire ne renferme ni chitine ni cellulose mais du peptidoglycane, et leur cytologie est celle des bactéries. Ces caractères s'ajoutent à d'autres comme la sensibilité à des actinophages et à des antibactériens, qui confirment le bien-fondé de la classification des actinomycètes parmi les bactéries (Larpent, 1989 ; Mariat et Sebald, 1990). Leur analyse

génomique a par la suite confirmé cette classification (**Stackebrandt, 1997**). Ainsi, les similarités morphologiques des actinomycètes et des champignons apparaissent plutôt liées au fait que ces microorganismes colonisent des écosystèmes voisins (en particulier le sol), et ont donc développé au cours de l'évolution des modes de reproduction, de dissémination et de croissance voisins.

II. Historique

L'histoire des actinomycètes peut être divisée en 5 grandes périodes. La première période qui va de 1877 à 1890 environ, a été nommée « période médicale » du fait que l'intérêt porté à ces microorganismes était dû presque exclusivement aux propriétés pathogènes qu'on leur attribuait (**Baldacci, 1962**). La seconde période (1900-1940) (**Mariat et Sebald, 1990**) se rapporte à la mise en évidence et à l'étude des actinomycètes du sol, avec les travaux de **Rossi-Doria** (1890-91), **Gasparini** (1891-94), **Krainsky** (1914), **Waksman** (1919), **Lieske** (1921), **Orskov** (1925), **Jensen** (1931-33) et **Krassinikov** (1938). Elle couvre la découverte des conditions saprophytiques d'habitat des actinomycètes et les premières tentatives pour distinguer deux groupes : les pathogènes et les saprophytes.

L'époque suivante est celle de la découverte des antibiotiques produits par les actinomycètes. Elle commence en **1940** et le nom de **Waksman** lui est indiscutablement lié avec la découverte, en 1944, de la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* (**Le minor, 1989 ; Sanglier et Trujillo, 1997**). Cette période a résulté en un accroissement brusque du nombre d'espèces décrites (**Baldacci, 1962**). Ainsi, la période suivante (1940-1970) peut être définie comme une période de développement de critères morphologiques et biochimiques pour la classification des actinomycètes, en parallèle avec la meilleure compréhension de la physiologie de ces bactéries de leur intérêt pour la production de métabolites secondaires et leur potentialité de biodégradation de composés organiques. Enfin, depuis les années 1960, l'essor des méthodes de génétique, initiées par **Hopwood (Chater, 1999 ; Hopwood, 1973)** puis de génomique (**Hopwood, 2003**) a révolutionné la classification des espèces (**Ventura, 2007**) puis les méthodes de découverte de métabolites secondaires (**Donadio, 2002**) et d'exploration du potentiel biotechnologique de ces microorganismes.

III. Morphologie

La morphologie des actinomycètes ressemble fortement à celle des mycètes (Prescott *et al.*, 1997). Toutefois, le diamètre des hyphes, habituellement de 0,5 à 1 µm (Eunice, 1983), est deux à dix fois plus petit que celui des champignons (de 2 à 5 µm) (Gottlieb, 1973). Le mycélium des actinomycètes présente une grande diversité de morphologies. On rencontre (i) des espèces dont le mycélium est rudimentaire au point d'être inexistant (la plupart des *Mycobacterium*), (ii) d'autres au mycélium fugace, qui se fragmente (certaines *Nocardia*), et enfin (iii) des espèces au mycélium développé et persistant comme dans le genre *Streptomyces*. Les mycéliums fragmentaire et permanent sont illustrés sur la figure 2.

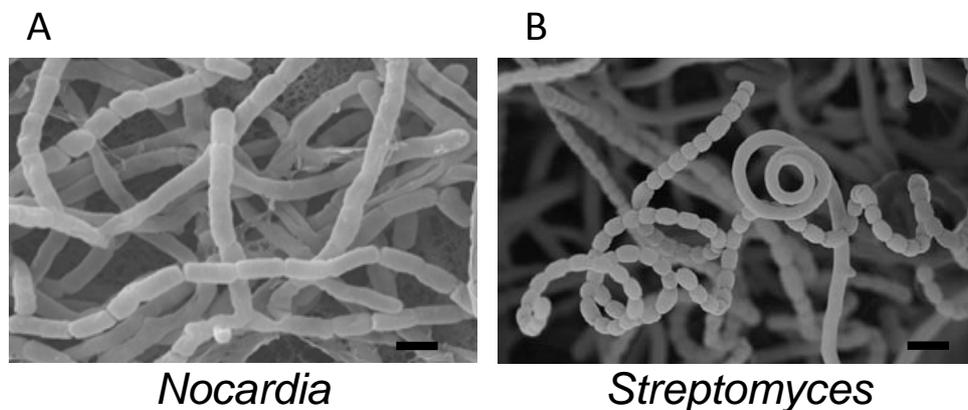


Figure 2 : Clichés de microscopie électronique à balayage illustrant les types fragmentaire et permanent du mycélium des actinomycètes. (A) Bactéries du genre *Nocardia* qui se fragmentent, (B) Bactéries du genre *Streptomyces* en sporulation. Barre d'échelle : 1 µm.

Le mycélium permanent peut être organisé en mycélium végétatif (appelé aussi mycélium de substrat ou mycélium de base) et/ou en mycélium aérien. On distingue trois cas :

- Soit seul le mycélium végétatif est formé (exemple : *Frankia*, *Dactylosporangium*). La croissance a lieu soit au sein, soit à la surface du milieu. Le mycélium est coénocytique : il renferme un cytoplasme commun multi-nucléoïde, et est donc dépourvu de septum.
- Soit il y a formation de mycélium végétatif puis de mycélium aérien mûri en conidies (exemple : *Streptomyces*). Le mycélium aérien croît à la surface du mycélium végétatif et utilise ce dernier comme substrat.

- Soit, seul le mycélium aérien est formé, ce qui n'est rencontré que pour le genre *Sporichthya*, dont les hyphes du mycélium aérien sont attachées au substratum par des crampons (Djaballah , 2010).

La plupart des actinomycètes sont immobiles. Cependant, certains produisent des spores flagellées, appelées zoospores, permettant leur dispersion dans les habitats aquatiques. Les spores d'actinomycètes présentent une grande variété d'arrangements. Les spores peuvent être produites isolément (*Micromonospora*), deux à deux longitudinalement (*Microbispora*), en courtes chaînettes (*Actinomadura*), en longues chaînettes (*Streptomyces*). Les chaînettes de spores peuvent être ramifiées ou non, droites, flexibles ou en spirales. Elles peuvent être rayonnantes autour d'hyphes sporophores. On rencontre également une importante diversité au niveau de la surface des spores : lisse, ridée, avec piquants ou d'aspect velu (Figure 3). Chez certains genres, les spores sont contenues dans un sporange : compartiment qui se développe à l'extrémité d'un hyphe spécial appelé sporangiophore (Figure 4). Les sporanges contiennent quelques à plusieurs milliers de spores, formant des chaînes enroulées ou parallèles.

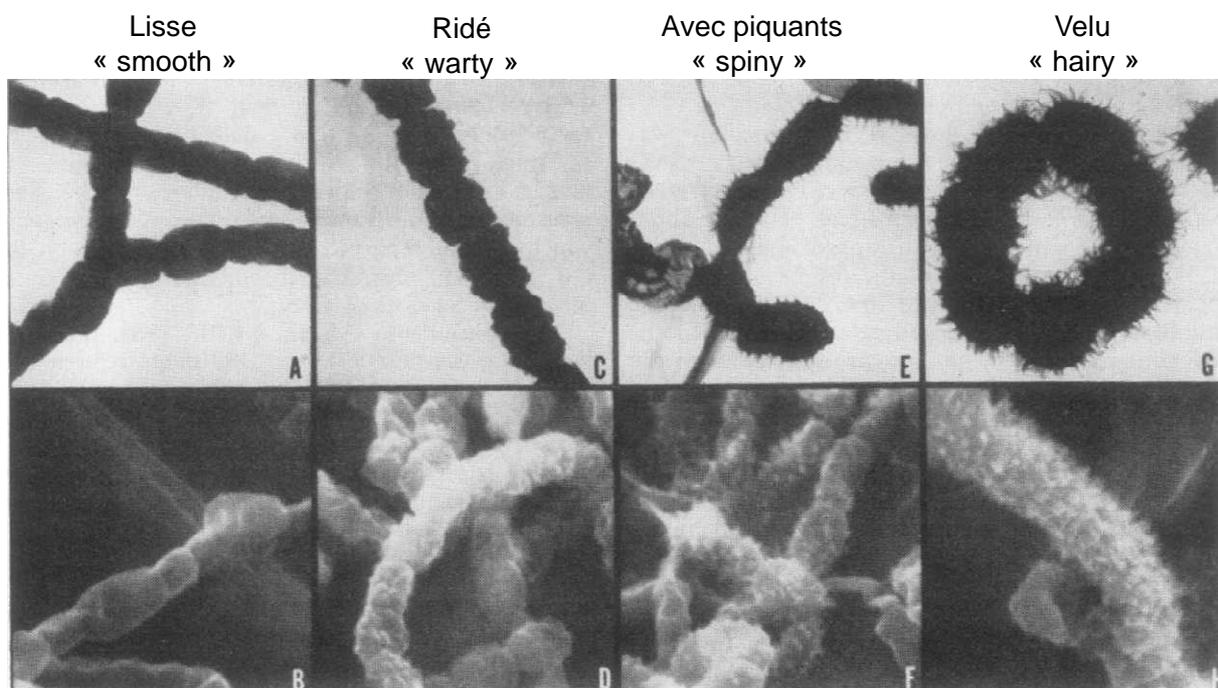


Figure 3 : Clichés de microscopie électronique illustrant la diversité des types de surface de spores chez le genre *Streptomyces* (Lyons et Pridham, 1971; Dietz et Mathews, 1971).

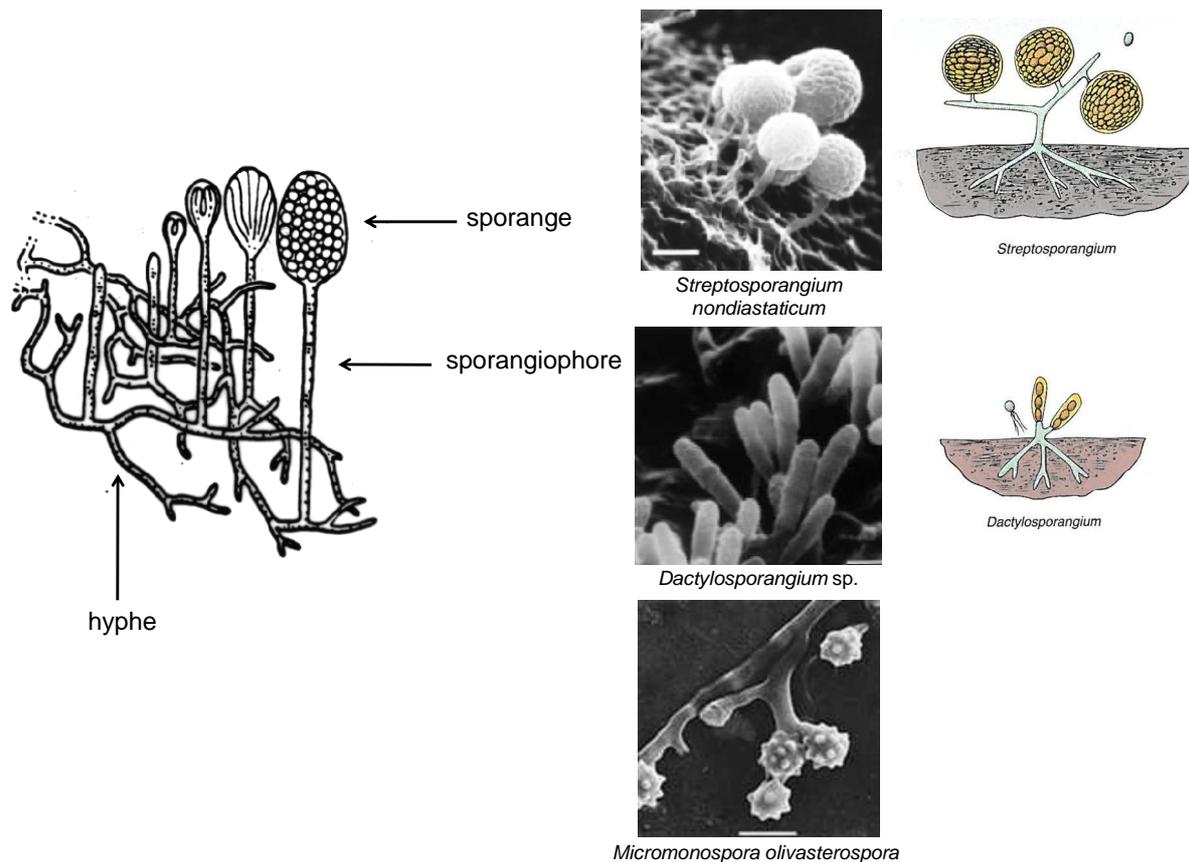


Figure 4 : Représentation schématique et clichés de microscopie électronique à balayage montrant différents sporanges d'actinomycètes.

Les colonies formées sur milieu solide par les actinomycètes sont très particulières. Elles résultent de l'accumulation des hyphes ramifiés et non pas de cellules comme c'est le cas chez les bactéries non filamenteuses. Le diamètre des colonies est variable de 1 à 10 mm. L'aspect des colonies peut être compact, sec, lisse, rugueux à contours lisse ou échancrés. Les colonies sont souvent pigmentées (blanc, crème, jaune, violet, rose, gris, etc... (Perry *et al.*, 2004). En culture liquide sans agitation, les hyphes formés après la germination des spores montent en surface pour croître en contact de l'air (Keulen *et al.*, 2003). Cependant, en milieu liquide avec agitation, il n'y a pas de formation du mycélium aérien ni de spores. Les *Streptomyces* forment d'abord des filaments libres, qui se ramifient et s'entremêlent pour former des agrégats (Figure 5). Ces derniers, généralement sphériques sont composés d'une masse dense d'hyphes enroulés. Les cellules du centre étant privées de nutriment, les agrégats grossissent seulement par la formation de cellules à la surface de la sphère (Reichl *et al.*, 1992; Tamura *et al.*, 1997).

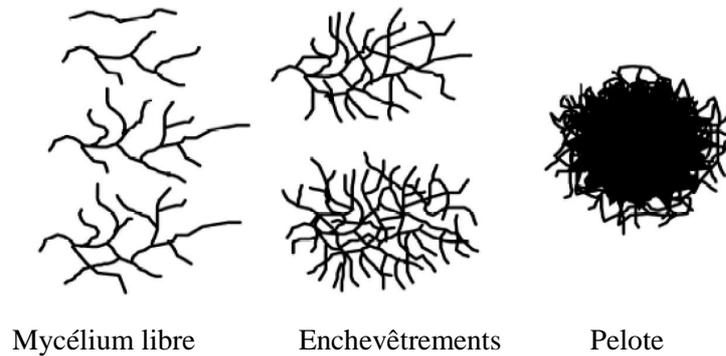


Figure 5: Morphologies rencontrées au cours de cultures liquides (Amanullah *et al.*, 2000).

Enfin, il existe d'autres structures morphologiques plus atypiques. Certains actinomycètes forment des structures particulières qui ne correspondent ni au mycélium ni aux spores et dont la fonction n'est pas toujours définie.

Ainsi les **sclérotés** trouvés chez *Chainia* sont constitués par une masse d'hyphes cloisonnés dont les vacuoles sont chargées de triglycérides et d'acides gras ramifiés.

Les **Synnemata**, appelés également **corémies** sont des assemblages compacts d'hyphes dressés, parfois fusionnés et portant des conidies apicales ou latérales. Cette structure est caractéristique du genre *Actinosynnema*.

Des vésicules appelés **sporanges**, contenant des spores. Ils peuvent être rencontrés sur le mycélium aérien bien développé ou sur la surface de colonies dépourvues ou ayant un mycélium aérien peu développé. Ils sont présents chez les *Frankia* et les *Dactylosporangium* (Theilleux, 1993).

Les **conidies** sont des spores asexuées qui peuvent avoir plusieurs organisations :

- une seule conidie tel que le genre *Micromonospora* ;
- une paire de conidies chez le genre *Microbispora* ;
- chaînes courtes de conidies formées d'un nombre inférieur ou égale à 20 spores par chaîne ;
- longues chaînes de conidies formées d'un nombre plus de 20 spores par chaîne ;
- conidies rassemblées dans des synnemata (spores mobiles et qui peuvent être libérées).

IV. Ecologie et distribution dans la nature

Les actinomycètes sont des microorganismes ubiquitaires que l'on rencontre sur tous les substrats naturels courants, et en particulier le sol (Lacey, 1973; Porter, 1971; Waksman, 1959; Williams *et al.*, 1984). Dans le sol, de nombreuses actinomycètes sont saprophytes et participent à la dégradation de la matière organique et à la formation de l'humus, tout comme les champignons. Les actinomycètes du sol sont surtout présents en surface, entre 0 et 2 m de profondeur. Ils produisent des substances spécifiques telles que la géosmine et le 2-méthyl isobornéol qui sont responsables de l'odeur caractéristique des sols (Omura, 1992; Zaitlin *et al.*, 2003; Zaitlin et Watson, 2006). Leurs proportions par rapport aux autres microorganismes oscillent entre 10 et 50 %. Les genres *Streptomyces*, *Nocardia* et *Micromonospora* sont les plus fréquents, le genre *Streptomyces* couvre à lui seul 95 % des 5000 souches d'actinomycètes isolées à partir de 16 types de sols (Tableau 1) (Lechevalier et Lechevalier, 1967). Le nombre de ces microorganismes atteint est de l'ordre de 10^6 germes par gramme de sol séché, d'après (Goodfellow et Williams, 1983). D'après (Waksman, 1967), le rapport microorganisme totaux / actinomycètes, diminue au fur et à mesure que la profondeur augmente. Selon ce même auteur, la couche superficielle contient au moins 80% de bactéries actinomycétales par rapport au nombre total des microorganismes, tandis que la couche située à une profondeur de 80 cm n'en contient plus que 16 à 40% (Ouhdouch, 1989). Les actinomycètes sont généralement plus nombreux que les champignons, mais moins abondants que les autres bactéries.

Tableau 1 : Fréquence des divers genres d'actinomycètes dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents (Lechevalier et Lechevalier, 1967).

Genre	Pourcentage
<i>Streptomyces</i>	95,34
<i>Nocardia</i>	1,98
<i>Micromonospora</i>	1,4
<i>Thermomonospora</i>	0,22
<i>Actinoplanes</i>	0,20
<i>Microbispora</i>	0,18
<i>Mycobacterium</i>	0,14
<i>Streptosporangium</i>	0,10
<i>Actinomadura</i>	0,10
<i>Micropolyspora</i>	0,10
<i>Pseudonocardia</i>	0,06
<i>Microellobosporia</i>	0,04

L'essor des techniques moléculaires, principalement basées sur l'analyse des séquences d'ADNr 16S, a permis la mise en évidence d'une grande diversité phylogénétique dans l'écosystème. Toutefois, cette image de la diversité ne reflète pas la diversité des phénotypes. En effet, ces séquences ne permettent pas toujours d'inférer un fonctionnement métabolique et donc un rôle écologique aux microorganismes détectés en particulier lorsqu'ils appartiennent à des lignées qui ne sont représentées par aucun membre cultivé. Les techniques de culture classiques, impliquant une sélection des microorganismes cultivés, fournissent une image restreinte de la diversité microbienne d'un écosystème (**Kitouni, 2007**). Cependant, certaines études décrivent l'isolement de microorganismes nouveaux à partir d'échantillons environnementaux dont l'inventaire moléculaire n'en avait pas permis la détection (**Alain et al., 2004 ; Gonzalez-Toril et al., 2003**). Il apparaît alors clairement qu'aucune des deux approches, culturale ou moléculaire, ne permettra seule d'élucider les questions d'écologie microbienne, concernant par exemple la biodiversité, le fonctionnement et la dynamique des communautés microbiennes (**Leadbetter, 2003**).

Les actinomycètes ont été également isolés à partir de nombreux environnements aquatiques : (i) eau de mer et de sédiments marins (**Jensen et al., 1991; Ghanem et al., 2000**), (ii) eau douce (**Kitouni et al., 2005**), eau issue de marécages salés (**Al-Zarban et al., 2002 ; Boughachiche et al., 2005**).

Généralement, les actinomycètes préfèrent un pH neutre ou peu alcalin et sont mésophiles. Toutefois, différents actinomycètes ont été isolés à partir d'écosystèmes présentant des conditions de température, de pression, de teneur en sel et/ou de pH hostiles : sols polaires gelés en permanence, sols désertiques chauds et secs, pétrole brut, sols hautement contaminés par des métaux lourds, lacs extrêmement alcalins et lacs salés (**Goodfellow et Williams, 1983**). Les actinomycètes thermophiles tolèrent des températures allant jusqu'à 60°C (**Omura, 1992, Ensign et al., 1993**). Le genre *Streptomyces* a montré une capacité à s'adapter à différentes conditions hostiles, sous la forme de spores résistant à ces conditions : le froid (psychophilie), des teneurs en sels élevées (halophilie) ou des pressions élevées (barotolérance) (**Zaitlin et al., 2003**). Certaines genres d'actinomycètes semblent préférer certains habitats par rapport à d'autres (Tableau 2), comme *Thermoactinomyces* qui se trouve fréquemment dans les composts (**Song et al., 2001**), alors que le genre *Streptomyces* est très ubiquitaire (**Lacey, 1997**).

Les actinomycètes sont responsables d'un certain nombre de maladies de l'homme et de l'animal (**Pirouz et al., 1999**). Parmi les actinomycètes aérobies pathogènes, le genre *Nocardia* revêt une importance médicale particulière, de même que certains genres apparentés, tels que *Corynebacterium*, *Dietzia*, *Gordonia*, *Mycobacterium*, *Rhodococcus*, *Tsukamurella*, etc. (**Georghiou et Blacklock, 1992 ; Garrity et al. 2004 ; van de Sande, 2013**). Le mycétome, fréquemment observé en zone tropicale, constitue un cas particulier d'atteinte cutanée et sous-cutanée, et peut être dû à diverses espèces d'actinomycètes (*Nocardia*, *Actinomadura*, *Streptomyces*) ainsi qu'à des champignons.

Malgré le nombre important d'espèces de *Streptomyces*, seulement trois d'entre elles sont habituellement citées en pathologie humaine : *S. paragauyensis*, *S. griseus*, *S. somaliensis* (**Borelli et Middelveen, 1986**).

Certaines Mycobactéries sont la cause de pathologies animales, végétales et surtout humaines, comme *Mycobacterium tuberculosis* (agent de la Tuberculose) ou *Mycobacterium leprae* (agent de la lèpre) (**Vezeris et al., 2013**).

Enfin, certains actinomycètes sont des symbiotes de plantes (**Larpen et Larpen-Gourgaud, 1985**). Ainsi, dans la rhizosphère, les actinomycètes appartenant au genre *Frankia* sont extrêmement importants pour de nombreux types de plantes. Cette bactérie fixatrice d'azote (capable d'utiliser l'azote atmosphérique comme seule source d'azote) forme des nodules aux niveau des racines des angiospermes, et confère donc un avantage à la plante pour croître en sol pauvre en azote. Cette association est appelée association actinorhizienne (**Prescott et al., 2007**). Peu d'espèces sont phytopathogènes, l'exemple le plus étudié est *Streptomyces scabies*, responsable de la gale de la pomme de terre (**Lindholm, 1997**).

Tableau 2 : Habitats de certains actinomycètes (Grigorova et Norris, 1990).

Actinomycètes	Habitats
<i>Actinoplanes</i>	L'eau douce, la litière végétale, le sol.
<i>Frankia</i>	Les nodules racinaires des non-légumineuses.
<i>Micromonospora</i>	L'eau douce, les sédiments, les sols humides.
<i>Nocardia amarae</i>	Les boues activées.
<i>Rhodococcus coprophilus</i>	Les déjections animales, l'eau, le sol.
<i>Saccharopolyspora rectivirgula</i>	Moisi du foin.
<i>Streptomyces</i>	Le sol, la litière végétale, l'eau.
<i>Thermoactinomyces</i>	Le compost.

V. Métabolisme

La croissance des actinomycètes est plus lente que celle des autres bactéries; le temps de génération moyen est d'environ 2 à 3 heures (**Ottow et Glathe, 1968 ; Larpent et Sanglier, 1989**). Les Actinomycètes se séparent en deux groupes physiologiques. Le plus important est composé de germes ayant un métabolisme oxydatif et habitant surtout le sol. Le second rassemble des bactéries fermentatives, hôtes des cavités naturelles de l'homme et des animaux (**Le minor, 1989**). Les formes oxydatives, aérobies, sont localisées principalement dans le sol à partir duquel elles sont disséminées. L'archétype de cette catégorie est le genre *Streptomyces* (**Reponen et al., 1998**).

Les formes fermentatives, anaérobies strictes ou facultatives, sont illustrées par le genre *Actinomyces*. Ces organismes sont des saprophytes obligatoires des cavités naturelles de l'homme et des animaux supérieurs et ils ne sont jamais retrouvés dans le sol (**Mariat et Sebald, 1990**).

En général, les actinomycètes sont des bactéries chimoorganotrophes utilisant une grande variété de sources de carbone et d'énergie, y compris les biopolymères complexes (chitine, cellulose, lignine). Mais plusieurs espèces sont capables aussi de croissance chimioautotrophe utilisant l'oxydation de l'hydrogène comme source d'énergie et le gaz carbonique comme source de carbone (**Mariat et Sebald, 1990**).

VI. Critères d'identification

La définition des genres et des espèces se fonde sur un ensemble de caractères morphologiques, fonctionnels, chimiotaxonomiques et génomiques, rassemblés dans le tableau 3. L'ensemble des caractéristiques de chaque taxon bactérien est répertorié dans le manuel Bergey, un ouvrage de référence pour la taxonomie des bactéries, qui comprend un volume en deux parties dédié aux Actinobacteria (**Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2012**). Un manuel complémentaire plus succinct fournit une aide à l'identification (**Holt et al., 2000**).

Tableau 3 : Principaux critères utilisés pour la taxonomie des actinomycètes.

Critères taxonomiques		Références
Critères morphologiques et fonctionnels	Hyphes : présence, abondance et disposition des hyphes du mycélium végétatif ou du mycélium aérien Spores : nombre, mobilité, forme, position sur les hyphes Présence de sporanges Présence de sclérotés ou de synnématas Résistance des spores à la chaleur Résistance aux traitements acides	Schofield et Schaal, (1981); Demain et Solomon (1985)
Critères chimiotaxonomiques	Composition du peptidoglycane Composition en sucres cellulaires Composition phospholipidique des membranes Production d'antibiotiques Tests biochimiques : Réduction du nitrate Hydrolyse de l'urée Hydrolyse de l'acide hyppurique Synthèse de mélanine (<i>Streptomyces</i>)	Stanek et Roberts (1974) ; Lechevalier et al., (1977) ; Lechevalier et Lechevalier (1985); Larpent et Sanglier (1989)
Critères génomiques	%GC de l'ADN Digestions de l'ADN et analyse par électrophorèse en champ pulsé (DGGE) Séquence de l'ADNr 16S	(Stackebrandt, 1997; Ventura, 2007 ; Zhi, 2009).

Comme pour toutes les bactéries à Gram positif, la paroi cellulaire des actinomycètes comporte une épaisse couche de peptidoglycane (Vollmer, 2008). Le peptidoglycane est un polymère de chaînes linéaires polyosidiques, reliées par des segments peptidiques. La partie osidique consiste en une succession de blocs constitués de N-acétylglucosamine (GlcNAc) et d'acide N-acétylmuramique (MurNAc). Ces oses sont réticulés par des chaînes peptidiques de 4 acides aminés, associées deux à deux de façon covalente (Figure 6). Il existe une importante variabilité du peptidoglycane chez les bactéries, en particulier au niveau de la nature et la configuration des acides aminés et de la liaison entre chaînes peptidiques, ce qui fait de ces

caractéristiques biochimiques un critère taxonomique important (Becker, 1965; Schleifer et Kandler, 1972) (Tableau 4). Ainsi, le plus souvent, les formes fermentatives des actinomycètes présentent une lysine en troisième position de la chaîne peptidique (exemple : *Actinomyces*), tandis que les formes oxydatives présentent en cette position l'acide diaminopimélique (exemple : *Streptomyces*). La liaison entre deux chaînes peptidiques peut consister en une liaison covalente directe établie entre acides aminés de chaque chaîne (le plus souvent, le troisième d'une chaîne avec le quatrième de l'autre), ou bien impliquer un pont peptidique de quelques acides aminés (le plus souvent, un pont de cinq glycines) (Figure 7).

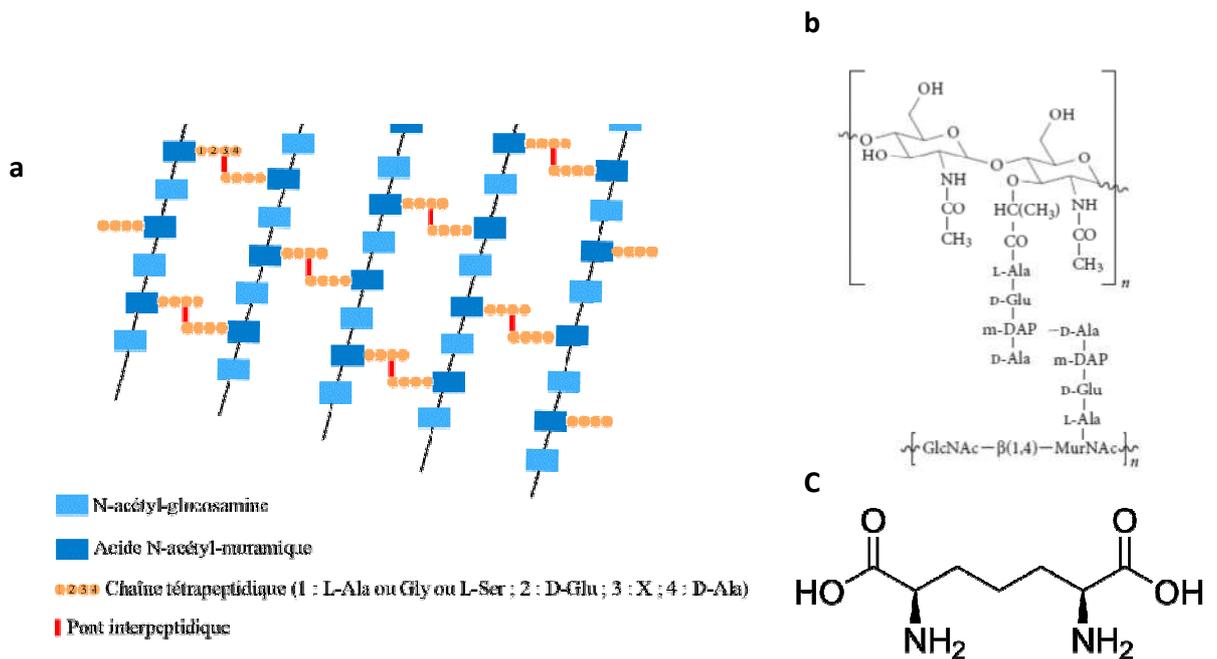


Figure 6 : Structure typique du peptidoglycane chez les Actinobactéries. a. Représentation schématique, b. Motif de base (DAP = acide diaminopimélique), entre crochets, c. Structure de l'acide diaminopimélique (ici en configuration méso).

Tableau 4 : Types de paroi cellulaire définis d’après des critères chimiotaxonomiques relatifs au peptidoglycane chez les Actinobacteria. NA : non applicable ou non déterminé (d’après (Lechevallier et Lechevallier, 1970; Becker, 1965)).

Type de paroi	Acide aminé en position 3	Glycine dans le pont interpeptidique	Sucres	Genres représentatifs
I	<i>L,L</i> -DAP	+	NA	<i>Nocardioïdes</i> <i>Streptomyces</i>
II	<i>Méso</i> -DAP	+	NA	<i>Micromonospora</i> <i>Pilimelia</i> <i>Actinoplanes</i>
III	<i>Méso</i> -DAP	-	NA	<i>Actinomadura</i> <i>Frankia</i>
IV	<i>Méso</i> -DAP	-	Arabinose, galactose	<i>Saccharomonospora</i> <i>Nocardia</i>
V*	Lysine	Selon les cas		
VI	Lysine	Selon les cas		<i>Streptomyces</i>

* Ce type, initialement différencié du type VI d’après la composition en acides aminés du peptidoglycane, n’est plus utilisé.

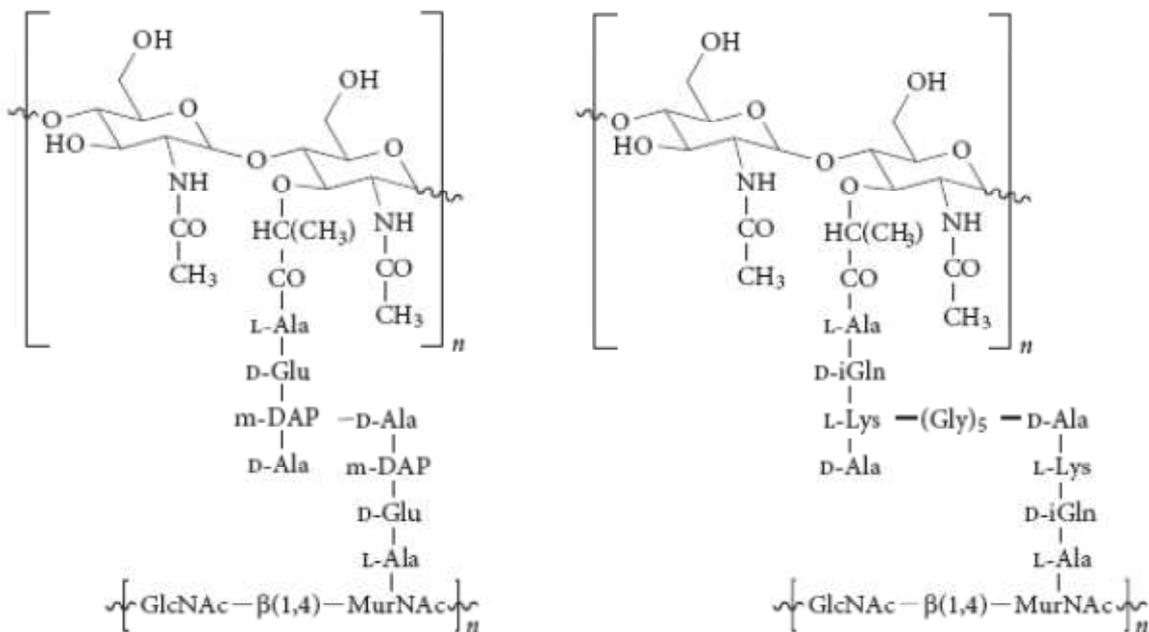


Figure 7 : Variabilité des chaînes peptidiques du peptidoglycane chez les actinomycètes (Royet et Dziarski, 2007). a. Peptidoglycane contenant de l’acide diaminopimélique (DAP), b. Peptidoglycane contenant de la lysine. Outre la différence de nature de l’acide aminé en position 3, on observe une variation au niveau du pont reliant les deux chaînes peptidiques : liaison directe entre acides aminés (a) ou pont de 5 glycines (b).

Une autre classification selon la composition et la structure du peptidoglycane a été proposée par Scheifer et Kanler (**Schleifer et Kandler, 1972**). Elle introduit une nomenclature à trois caractères : (i) une lettre capitale correspondant à l'appariement des acides aminés impliqués dans la liaison entre chaînes peptidiques (A pour une liaison entre les acides aminés 3 et 4, B pour liaison entre les acides aminés 2 et 4), (ii) un chiffre correspondant au type de pont entre acides aminés liés et (iii) une lettre grecque relative à la nature de l'acide aminé en position 3. Cette nomenclature est peu utilisée pour les actinomycètes étant donné qu'on rencontre principalement l'appariement 3-4 des acides aminés chez ces bactéries (**Vollmer, 2008**).

Par ailleurs, chez les actinomycètes présentant de l'acide méso-diaminopimélique (types II, III, IV), le profil en sucres cellulaires révèle la présence de sucres caractéristiques de certains genres (**Lechevallier et Lechevallier, 1970**), ce qui a permis une classification (Tableau 5).

Tableau 5 : Profils des sucres cellulaires totaux des Actinobacteria, (**Lechevallier et Lechevallier, 1970**).

Type de composition en sucres cellulaires	Sucres caractéristiques	Genres représentatifs
A	Arabinose, galactose	<i>Nocardia</i> , <i>Rhodococcus</i> , <i>Saccharomonospora</i>
B	Madurose	<i>Actinomadura</i> <i>Streptosporangium</i> <i>Dermaphilus</i>
C	Aucun	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i>
D	Arabinose, xylose	<i>Micromonospora</i> , <i>Actinoplanes</i>

Les critères morphologiques, fonctionnels et chimiotaxonomiques des actinomycètes ont permis de constituer différents groupes génériques présentant des caractéristiques bien distinctes (**Holt et al., 2000**), résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Caractéristiques chimiotaxonomiques et morphologiques des principaux groupes génériques d'actinomycètes (Prescott *et al.*, 2003).

Groupe générique	Type de paroi (peptidoglycane)	Type de composition en sucres cellulaires	Disposition des spores	Présence de sporanges	Genres représentatifs
Actinomycètes nocardioformes	I, IV	A	Variable	Non	<i>Nocardia</i> , <i>Thodococcus</i> , <i>Nocardioides</i> , <i>Saccharomonospora</i>
Actinomycètes à sporanges à loges multiples	III	B, C, D	Amas de spores	Habituellement	<i>Geodermatophilus</i> , <i>Dermatophilus</i> , <i>Frankia</i>
<i>Actinoplanes</i>	II	D	Variable	Habituellement	<i>Actinoplanes</i> , <i>Pilimelia</i> , <i>Dactylosporangium</i> , <i>Micromonospora</i>
<i>Streptomyces</i> et genres apparentés	I	Sans valeur taxonomique	Chaînes de 5 à plus de 50 spores	Non	<i>Streptomyces</i> , <i>Sporichthya</i>
Maduromycètes	III	B, C	Variable	Oui ou non	<i>Actinomadura</i> , <i>Microbispora</i> , <i>Planomonospora</i> , <i>Streptosporangium</i>
<i>Thermomonospora</i> et genres apparentés	III	C (parfois B)	Variable	Non	<i>Thermomonospora</i> , <i>Actinosynnema</i> , <i>Nocardiopsis</i>

Enfin, les lipides taxonomiquement importants peuvent être répartis par trois groupes : les lipides contenant une partie polaire, les ménaquinones et les acides mycoliques (Lechevalier et Lechevalier, 1980; Collin *et al.*, 1977). La caractérisation des lipides est particulièrement informative pour la mise en évidence du genre *Mycobacterium*, qui présente une paroi particulière riche en acides mycoliques.

Enfin, un outil de choix pour l'identification des actinomycètes est l'analyse moléculaire (des acides nucléiques). Le %GC donne une indication sur la famille, tandis que le séquençage de l'ADNr 16S permet de différencier nettement les genres (**Pridham et Gottlieb, 1948**). Les séquences de l'ADNr 16S ont servi à tracer toute la phylogénie des actinomycètes (**Stackebrandt, 1997; Ventura, 2007; Zhi, 2009**). Ces analyses moléculaires reposent sur une réaction de polymérase en chaîne (PCR), utilisant soit des amorces universelles bactériennes, soit des amorces spécifiques des Actinobacteria (**Farris et Olson, 2007 ; Schäfer et al., 2010**).

VII. Le genre *Streptomyces*

Streptomyces est un genre immense, avec plus de 500 espèces (**Hopwood, 2007**). C'est l'actinomycète le mieux étudié en termes de métabolisme, cycle de vie et génétique, du fait de l'intérêt considérable généré par ce genre bactérien pour la découverte d'antibiotiques.

VII.1. Cycle de vie

La structure complexe des colonies de *Streptomyces* (Figure 8a) montre le degré de différenciation d'un tel organisme. Le cycle biologique de *Streptomyces* est comparable à celui de nombreux micromycètes eucaryotes. Sur milieu solide, débute par la germination d'une spore qui donne naissance à un mycélium végétatif formé d'hyphes multi-nucléoïde, ramifiés et ancrés dans le milieu solide. Un mycélium aérien se développe sur ce mycélium végétatif, en utilisant ce dernier comme substrat. En effet, le mycélium végétatif s'autolyse et les produits de la lyse sont cannibalisés par le mycélium aérien (**Miguélez et al., 1999**). La croissance des hyphes est apicale (se fait par le sommet) (**Flårdh, 2003**), et s'accompagne de la formation de septa, conduisant à des unités uni-génomiques (Figure 9). Les cellules se différencient ensuite pour former des spores. Cela se traduit par l'épaississement des parois cellulaires (qui rend les spores plus résistantes à la dessiccation), une spiralisation des chaînes, accompagnée d'un dépôt de pigment gris. En milieu liquide, les cellules se développent uniquement sous forme de mycélium végétatif, même si certains Streptomycètes peuvent sporuler dans cet environnement (**Hodgson, 1992**).

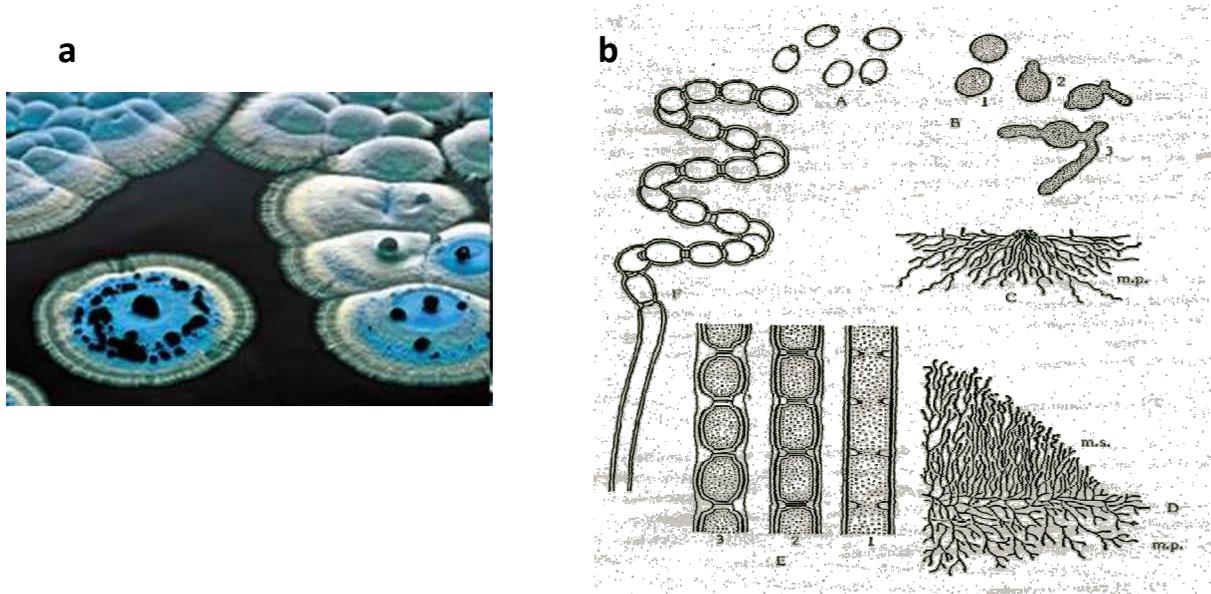


Figure 8 : Colonie et cycle biologique d'un streptomycète sur milieu solide. (a) Colonie de *Streptomyces coelicolor* (Hopwood, 2007). (b) Représentation schématique du cycle de vie de *Streptomyces* (Larpent et Sanglier, 1989) : A. Spores ; B. Germination des spores ; C. Coupe transversale dans une jeune colonie : formation du mycélium végétatif (mycélium primaire, m.p.) ; D. Coupe transversale d'une colonie mature ayant développé un mycélium aérien (mycélium secondaire, m.s.), produisant des spores ; E. Maturation du mycélium aérien (formation des septa) ; F. Chaîne de spores.

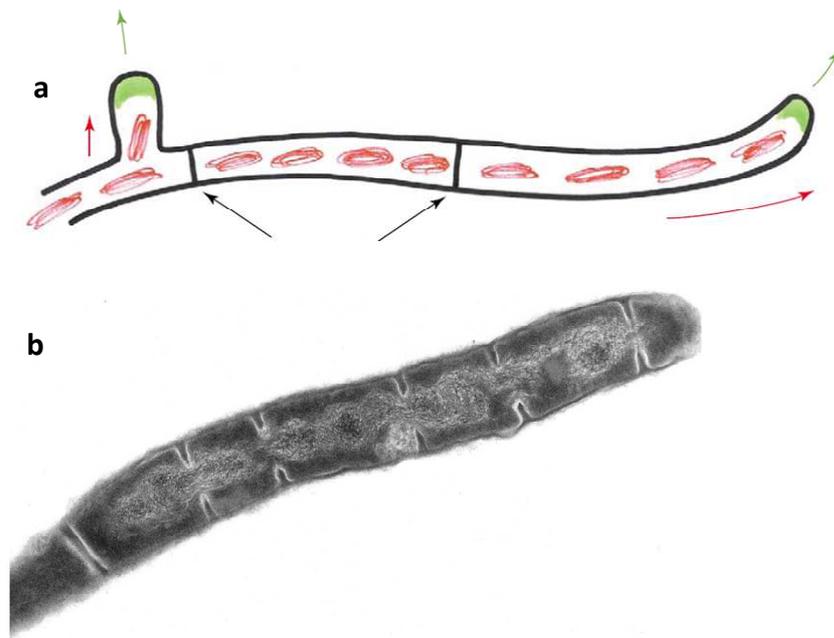


Figure 9 : Croissance apicale des hyphes du mycélium aérien et formation des septa. a. Représentation schématique (le peptidoglycane naissant est représenté en vert), b. Cliché de microscopie électronique à transmission d'une coupe d'hyphe.

La sporulation est contrôlée par des facteurs extérieurs aux microorganismes et par des facteurs propres à ceux-ci. C'est un processus hautement régulé (**McCormick et Flårdh, 2012**). Parmi les éléments extérieurs favorisant la sporulation, nous retiendrons principalement: la dessiccation, une concentration élevée en gélose, le glycérol comme source de carbone, l'urée comme source d'azote, l'addition de carbonate de calcium et d'extrait de sol, la présence de magnésium, de fer et de manganèse, et un pH légèrement alcalin voisin de 7,5.

VII.2. Génétique (Kieser *et al.*, 2000)

Streptomyces présente un des plus élevés des %GC bactériens, de 70 à 74%. *Streptomyces* contient un chromosome linéaire (**Lin *et al.*, 1993**), ce qui est une originalité chez les bactéries qui ont des chromosomes circulaires. Ce chromosome de grande taille (8 à 9 Mb) présente une organisation génétique unique (**Hopwood, 2006**). Alors que la région centrale, conservée au travers des espèces, contient les gènes « essentiels », les régions terminales sont spécifiques de souches et d'espèces et regroupent les gènes « accessoires ». Ces gènes accessoires représentent jusqu'à 20% du génome total. La plupart des souches de *Streptomyces* contiennent des plasmides, qui peuvent être circulaires ou linéaires.

VII.3 Production de biomolécules d'intérêt thérapeutique et biotechnologique

Streptomyces a révélé un potentiel biotechnologique intéressant pour la production d'enzymes (par exemple la xylose isomérase issue d'un Streptomycète thermophile (Hodgson (2000)) ou la biodégradation de biopolymères (par exemple le chitosane (**Fukamizo et Brzezinski, 1997**) ou de polluants organiques (par exemple l'acide phénylacétique (**Niraula *et al.*, 2010**)).

De plus, *Streptomyces* est la source la plus importante de métabolites secondaires présentant une activité biologique d'intérêt pour la santé humaine et animale : antibactérienne (streptomycine, tétracycline, chloramphénicol), antifongique (nystatine), antivirale (tunicamycine), antiparasitaire (ivermectine), immunosuppressive (rapamycine), antitumorale (actinomycine, mitomycine C, anthracyclines), inhibiteur d'enzyme (acide clavulanique) (**Demain, 2000**). En particulier, ce genre est remarquable pour le nombre et la diversité chimique des antibiotiques qu'il produit (**Watve *et al.*, 2001**).

VII.3.a. Antibiotiques

Le terme désigne tout composé chimique élaboré par un microorganisme (ou produit par synthèse), dont l'activité thérapeutique se manifeste à très faible dose d'une manière spécifique, par l'inhibition de certains processus vitaux, à l'égard des microorganismes sensibles. On distingue les activités bactériostatiques, qui inhibent la croissance microbienne, et les activités bactéricides, qui tuent. Souvent un même antibiotique peut exercer l'un ou l'autre de ces effets, en fonction de sa concentration (**Prescot, 1995**).

L'âge d'or dans la découverte des antibiotiques a été la période des années 1940-1960 (Figure 10), sous l'impulsion de Waksman (prix Nobel de physiologie et de médecine en 1952) (**Sherk, 2000**). Avec ses étudiants et collègues, Selman A. Waksman a isolé de nombreux antibiotiques sécrétés par des actinomycètes : actinomycine (1940), clavacine, streptothricine (1942), streptomycine (1943), griséine (1946), néomycine (1948), fradicine, candidine, candidine, etc... La streptomycine et la néomycine ont été largement utilisées pour le traitement d'infections (streptomycine : tuberculose, néomycine : applications locales). *Streptomyces* s'est révélé un producteur prodigieux d'antibiotiques, (**Procópio et al., 2012**).

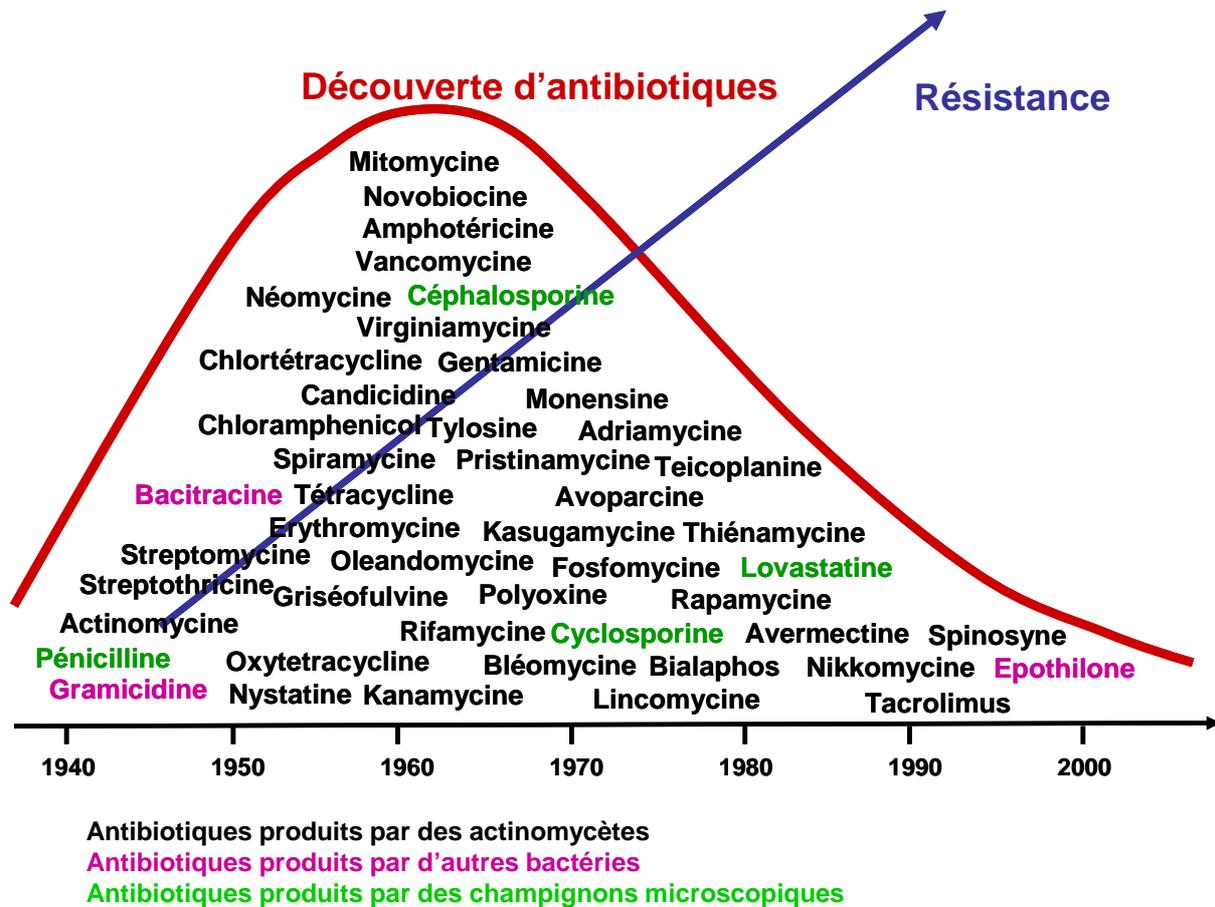
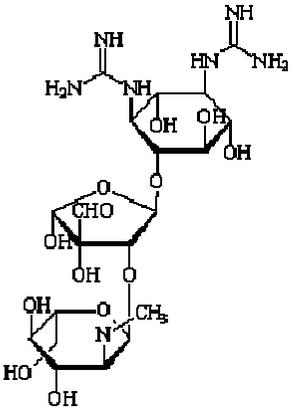
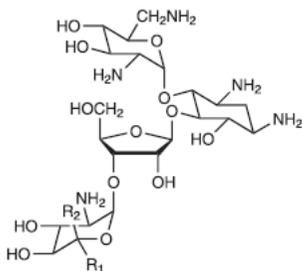
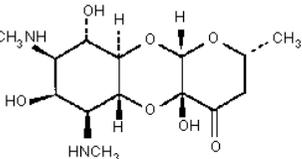
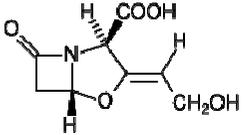
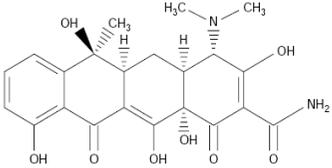
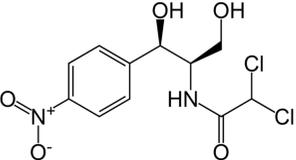
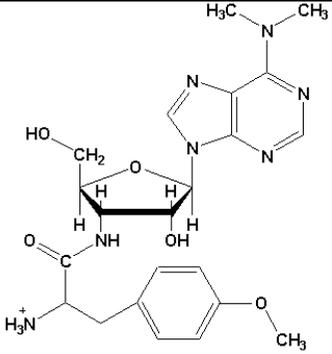


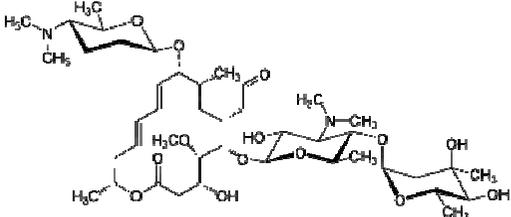
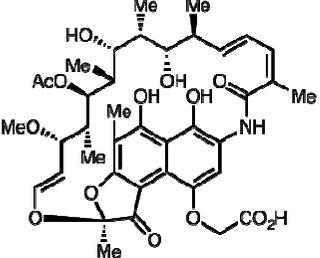
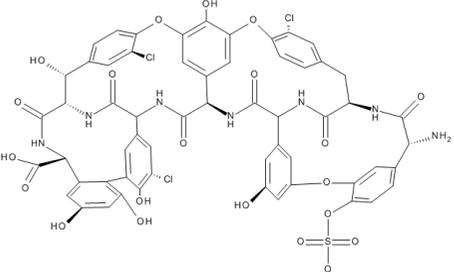
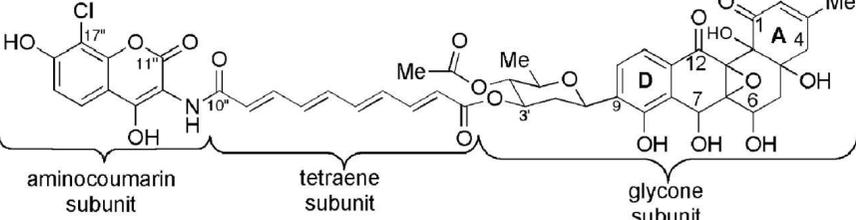
Figure 10 : Age d'or de la découverte des antibiotiques, d'après Hopwood (2007).

Les antibiotiques produits par *Streptomyces* montrent une grande diversité au niveau de de leur structures et de leurs cibles cellulaires, illustrée dans le tableau 7. Ils couvrent les familles de composés majeures commercialisées aujourd'hui : macrolides, glycopeptides, pénicillines, aminoglycosides, angucyclinones. Ils représentent aujourd'hui un marché considérable de vingt-huit milliards de dollars au niveau mondial (Thomson *et al.*, 2004).

Tableau 7 : Structures et cibles cellulaires d'antibiotiques produits par des souches du genre *Streptomyces*.

Nom	Bactérie productrice	Structure	Cible cellulaire et mécanisme d'action	Référence
Streptomycine	<i>Streptomyces griseus</i>		<p>Sous unité 30S du ribosome</p> <p>Inhibe la traduction des protéines (initiation)</p>	Jana et Deb (2006)
Néomycine	<i>Streptomyces fradiae</i>	 <p>Neomycin B (R₁=H, R₂=CH₂NH₂) Neomycin C (R₁=CH₂NH₂, R₂=H)</p>	<p>Sous unité 30S du ribosome</p> <p>Inhibe la traduction des protéines (initiation)</p>	Jana et Deb (2006)
Spectinomycine	<i>Streptomyces spectabilis</i>		<p>Sous unité 30S du ribosome</p> <p>Inhibe la traduction des protéines (initiation)</p>	Jana et Deb (2006)

<p>Acide clavulanique</p>	<p><i>Streptomyces clavuligerus</i></p>		<p>Inhibiteur de beta-lactamase (associé à un traitement par des antibiotiques de type beta-lactame)</p>	<p>Reading et Cole (1977)</p>
<p>Tétracycline</p>	<p><i>Streptomyces aureofaciens</i></p>		<p>Sous unité 30S du ribosome Inhibe la traduction des protéines (inhibe la liaison des aminoacyl-ARNt sur le site accepteur)</p>	<p>Tanaka et al. (1972)</p>
<p>Chloramphenicol</p>	<p><i>Streptomyces venezuelae</i></p>		<p>Sous unité 50S du ribosome Inhibe la traduction des protéines (inhibe l'activité peptidyl-transférase lors de l'élongation)</p>	<p>Malik (1972)</p>
<p>Puromycine</p>	<p><i>Streptomyces alboniger</i></p>		<p>Ribosome Inhibe la traduction des protéines (relargage de peptides tronqués)</p>	<p>Traut et Monro (1964)</p>

<p>Spiramycine</p>	<p><i>Streptomyces ambofaciens</i></p>		<p>Sous unité 50S du ribosome</p> <p>Inhibe la traduction des protéines (inhibe la translocation lors de l'élongation)</p>	<p>Ahmed (1968)</p>
<p>Rifamycine B</p>	<p><i>Streptomyces mediterranei</i></p>		<p>ARN polymérase</p> <p>Inhibe la transcription</p>	<p>Wehrli et al. (1968)</p>
<p>A47934</p>	<p><i>Streptomyces toyocaensis</i></p>		<p>Lipide II / peptidoglycane</p> <p>Inhibe la synthèse des parois bactériennes</p>	<p>Boeck et (1986)</p>
<p>Simocyclinone D8</p>	<p><i>Streptomyces antibioticus</i></p>	 <p>aminocoumarin subunit tetraene subunit glycone subunit</p>	<p>ADN gyrase</p> <p>Inhibe la synthèse d'ADN (réplication)</p>	<p>Oppegard et al. (2009)</p>

Malgré la révolution apportée par les antibiotiques dans le domaine de la médecine et la découverte de milliers de composés, les maladies infectieuses restent un problème de santé publique majeure. Ceci s'explique notamment par l'apparition de souches multi-résistantes à ces molécules (**van der Waaij et Nord, 2000**). Ainsi, la recherche et le développement de nouveaux antibiotiques est toujours un enjeu sociétal très important.

VII.3.b. Peptides bioactifs

VII.3.b.1. Les peptides antimicrobiens chez les êtres vivants

Les peptides antimicrobiens sont des antibiotiques naturels et sont des composants clés des systèmes de la défense immunitaire innée, non-adaptative des organismes multicellulaires animaux et végétaux (**Hoffmann et al., 1999; Ganz et Lehrer, 1998 ; Lehrer et Ganz, 1999**). Il s'agit d'un ensemble de petites protéines, comportant en moyenne de 20 à 50 acides aminés, qui partagent un caractère cationique et des propriétés amphiphiles. A présent, plus de 750 différents peptides antimicrobiens ont été identifiés dans divers organismes couvrant les procaryotes, les plantes, les insectes, et les animaux (y compris les êtres humains) (**Boman, 1998 ; Lehrer et Ganz, 1996 ; Garcia-Olmedo et al., 1998; Wong et al., 2007**).

VII.3.b.2. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries

Les peptides antimicrobiens synthétisés par voie ribosomique chez les bactéries sont des molécules de nature protéique ou partiellement protéique, douées d'une activité antagoniste vis-à-vis de souches phylogénétiquement proches des souches productrices, ou occupant les mêmes niches écologiques. Leur synthèse, par voie ribosomique, les différencie des antibiotiques qui résultent d'un assemblage enzymatique. Deux grands groupes de peptides antimicrobiens sont distingués avec, d'une part, les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif, représentés par les microcines, et d'autre part, les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif, et notamment les peptides antimicrobiens de bactéries lactiques (**Nissen-Meyer et Nes, 1997**). La plupart de ces peptides antimicrobiens sont nommés bactériocines.

VII.3.b.3. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif

Les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram négatif sont représentés par les microcines (taille inférieure à 10 kDa) produites par des bactéries appartenant à la famille des *Enterobacteriaceae* et surtout *E. coli* (Dirix *et al.*, 2004). Le terme microcine a été conçu pour distinguer une nouvelle classe de peptides antibactériens des colicines qui sont des protéines à activité antimicrobienne produites par *E. coli* (Duquesne *et al.*, 2007).

Les microcines regroupent actuellement 10 peptides qui se répartissent en deux classes, les microcines de classe I et les microcines de classe II, qui diffèrent l'une de l'autre de part leur mode d'action (Pons *et al.*, 2002). Les microcines de classe I ciblent des enzymes intervenant dans la structuration et la synthèse d'ADN/ARN tandis que celles de classe II interagissent avec les membranes bactériennes.

Les **microcines de classe I** ont une masse moléculaire comprise entre 1 et 3 kDa et arborent de nombreuses modifications post-traductionnelles. Elles sont codées par plusieurs gènes (4 à 7) portés par un plasmide. Le gène d'immunité n'est cependant pas localisé à côté du gène de structure. Les membres de cette famille sont MccB17, MccC7/C51 et MccJ25.

Les **microcines de classe II** nécessitent la présence du gène chromosomique *tolC* (codant pour un transporteur membranaire de la membrane externe) pour être fonctionnelles (Pons *et al.*, 2004). Elles se subdivisent en deux sous groupes, les microcines de classe IIa et IIb, selon la localisation des gènes. Les microcines de classe IIa (MccV originellement nommé ColV, MccL et Mcc24) sont codées par 4 gènes plasmidiques ayant une organisation conservée entre les différentes microcines. Les microcines de classe IIb (MccE492, MccH47, MccI47 et MccM) sont codées par des gènes chromosomiques, contrairement aux autres microcines précédemment décrites (Duquesne *et al.*, 2007).

VII.3.b.4. Peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif

La production de peptides antimicrobiens par les bactéries à Gram positif a été largement étudiée et en particulier les bactériocines produites par les bactéries lactiques. En effet, au cours des 20 dernières années, les travaux sur ces bactériocines ont été conduits, avec pour objectif, de développer de nouvelles techniques de protection alimentaire pouvant limiter la détérioration des aliments et les risques d'infections alimentaires. C'est par exemple le cas de la nisine qui est le seul peptide antimicrobien autorisé en tant que conservateur alimentaire (Galvez *et al.*, 2007).

VII.3.c. Les peptides lasso

Une catégorie de peptides compacts est particulièrement originale car elle possède une topologie dite « en lasso » consistant en un noeud moléculaire particulier. Les peptides lasso comportent un cycle macrolactame formé par les 8 ou 9 résidus de la partie N-terminale à l'intérieur duquel est enchâssée la partie C-terminale. Le cycle est constitué par une liaison lactame établie entre le résidu Gly ou Cys N-terminal et le carboxylate de la chaîne latérale d'un résidu Asp ou Glu (**Maksimov *et al.*, 2012 ; Rosengren et Craik, 2009**).

Les peptides lasso sont produits par deux groupes d'eubactéries environnementales : les actinobactéries et les protéobactéries. Le premier peptide de cette famille caractérisé a été l'**anantine**134 isolée de *Streptomyces coeruleus*. Le onzième, et dernier à ce jour, a été isolé de *Asticcacaulis excentricus* en 2012 et baptisé **astexine-1135**. On peut noter la grande représentation des espèces de *Streptomyces* dans la liste des bactéries productrices de peptides lasso (Tableau 8) (**Ducasse, 2012**).

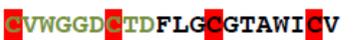
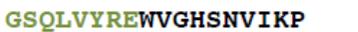
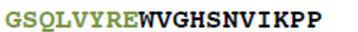
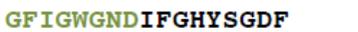
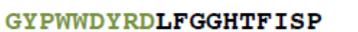
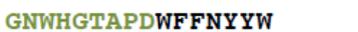
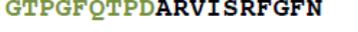
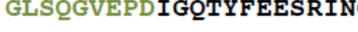
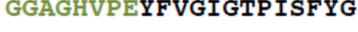
Nom	Séquence	Activité biologique	Bactéries productrices	Méthode	Facteurs stabilisant
Classe I					
MS-271 (Siamycine I)		Antibactériens Anti-VIH et anti-HSV	<i>Streptomyces</i> sp. M-271 ¹⁶⁰⁻¹⁶²	RMN ¹⁶³	Ponts disulfure
Siamycine II		Inhibiteurs de l'aspartyl-protéase, de la MLCK	<i>Streptomyces</i> sp. SP9440 ^{137,138}	-	-
RP-71955 (Aborycine)				RMN ¹⁴⁸	Ponts disulfure
SSV-2083		?	<i>Streptomyces sviceus</i> ATCC 29083 ¹⁵⁵	-	-
Classe II					
Lariatine A		Anti-mycobactériens	<i>Rhodococcus</i> sp. K01- B0171 ^{153,164}	RMN ¹⁵³	Mobilité de la partie C-terminale
Lariatine B				-	-
Anantine		Antagoniste du récepteur de l'ANF	<i>Streptomyces coerulescens</i> ¹³⁴	-	-
Propeptine		Inhibiteur de la PEP	<i>Microbispora</i> sp. SNA-115 ¹⁴²	-	-
RES-701-1		Antagoniste du récepteur ET _B	<i>Streptomyces</i> sp. RE-701 ¹⁴⁰	RMN ¹⁵⁰	Tyr14 et Tyr15 autour du cycle
RES-701-3		Antagoniste du récepteur ET _B	<i>Streptomyces</i> sp. RE-701 ¹⁴¹	-	-
Capistruine		Antibactérien (Inhibiteur de l'ARNpol)	<i>Burkholderia thailandensis</i> E264 ¹⁵⁴	RMN ¹⁵⁴	Arg15 sous le cycle
Astexine-1		Antibactérien	<i>Asticcacaulis excentricus</i> ¹³⁵	RMN ¹³⁵	Arg19 sous le cycle
MccJ25		Antibactérien (Inhibiteur de l'ARNpol)	<i>Escherichia coli</i> AY25 ¹³⁶	RMN ¹⁴⁵⁻¹⁴⁷	Phe19 et Tyr20 autour du cycle
SRO15-2005		?	<i>Streptomyces roseosporus</i> NRRL 15998 ¹⁵⁵	-	-
Classe III					
BI-32169		Antagoniste du récepteur du glucagon	<i>Streptomyces</i> sp. (DSM 14996) ¹⁵¹	RMN ¹⁵¹ RX ¹⁵²	Pont disulfure

Tableau 8 : Tableau des classes de peptide lasso, de leurs structures et de leurs activités biologiques. Les acides aminés constituant le cycle macrolactame sont représentés en vert. Les ponts disulfure, représentés en rouge, ne sont explicités que pour MS-271 pour les peptides de classe I mais ils sont présents dans le même arrangement chez chaque peptide de ce type (Ducasse, 2012).

La découverte des peptides lasso est intimement liée à celle de molécules naturelles possédant des activités biologiques d'intérêt thérapeutique. L'anantine a ainsi été découverte suite à un criblage d'activité de centaines de molécules antagonistes du récepteur du facteur natriurétique auriculaire (**Weber et al., 1991**) (ANF, une hormone peptidique synthétisée par l'oreille droite du cœur). La **microcine J25** (MccJ25), découverte un an plus tard (**Salomón et Farías, 1992**), a été identifiée dans le cadre de recherches portant sur les microcines, peptides antimicrobiens produits par des entérobactéries et notamment par des souches d'*E. coli* (**Duquesne et al., 2007**). Le peptide **RP-71955**, aussi appelé aborycine, a quant à lui été découvert lors d'un criblage d'activité de molécules inhibant deux protéases impliquées dans le mode d'action du virus d'immunodéficience humaine (**Helynck et al., 1993**) (HIV-1) et a fait l'objet d'un brevet, alors même que sa structure et son mode d'action n'étaient pas encore résolus (**Helynck, 1994**). Les **siamycines** ainsi que les peptides **RES-701-1** et **RES-701-3** ont été détectés dans une recherche systématique de produits bioactifs (**Tsunakawa et al., 1995 ; Morishita et al., 1994 ; Ogawa et al., 1995**). Enfin, la **propeptine** a été isolée dans la cadre d'un screening d'activité inhibitrice de la prolyl-endopeptidase (PEP) dont l'activité chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer est plus importante que dans le reste de la population (**Kimura et al., 1997**).

Ces premiers peptides lasso ont tous été analysés dans le but de trouver des molécules bioactives mais la résolution de la structure lasso chez MccJ25 (**Blond et al., 1999 ; Blond et al., 2001 ; Rosengren et al., 2003 ; Bayro et al., 2003 ; Wilson et al., 2003**) a relancé l'intérêt de la communauté scientifique pour ces peptides. La découverte de cette structure originale, bien que déjà résolue pour RP-71955, la siamycine I et RES-701-1 (**Frechet et al., 1994 ; Katahira et al., 1996 ; Katahira et al., 1995**), associée à leurs activités intéressantes a initié une nouvelle phase dans l'étude des peptides lasso.

Le peptide **BI-32169**, qui a d'abord été décrit comme un peptide bicyclique (**Potterat et al., 2004**), a été découvert sept ans plus tard que la propeptine et n'a été décrit comme étant en lasso que plus tard (**Knappe, 2010**). A la suite de la résolution de la structure de MccJ25 et de BI-32169, les **lariatines A et B** (**Iwatsuki, 2010**), la **capistruine** (**Knappe, 2010**) ainsi que l'**astexine-1** (**Maksimov, 2012**) ont été les derniers peptides de cette catégorie isolés jusqu'à présent et décrits comme lasso. La découverte de la capistruine et de l'astexine-1 s'est basée sur une technique d'exploration de génomes *in silico* (« genome mining ») novatrice qui permet de franchir une nouvelle étape dans la découverte de ces peptides originaux. Associée à la spectrométrie de masse (MS), cette méthode a permis de prédire et de détecter de

nouveaux peptides lasso chez *Streptomyces*, les peptides **SSV-2083** et **SRO15-2005**, mais qui n'ont pas été isolés, ni caractérisés structuralement (Kersten, 2010 ; Ducasse *et al.*, 2012).

Malgré une caractéristique structurale commune, à savoir la présence d'un cycle macrolactame et l'insertion de la partie C-terminale dedans, les peptides lasso présentent certaines différences structurales. La plus importante porte sur le nombre de ponts disulfure dont est doté chaque peptide et qui permet d'établir une classification (Figure 11). Les peptides lasso de **classe I** possèdent deux ponts disulfure, entre Cys1 et Cys13 d'une part et Cys7 et Cys19 d'autre part, les peptides de **classe II** n'en possèdent aucun et le peptide de **classe III** n'en possède qu'un seul (Tableau 08).

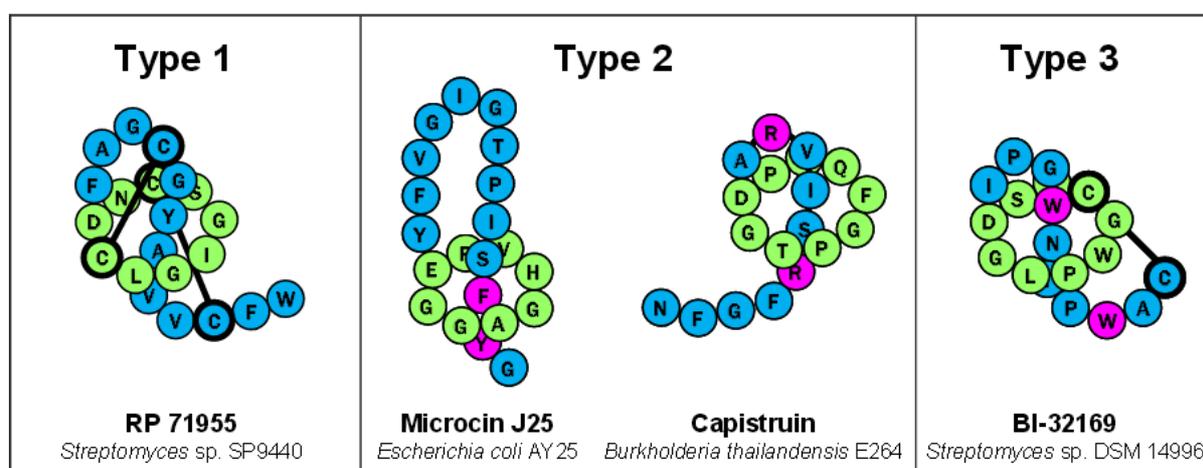


Figure 11: Représentants des trois types de peptides lasso (comportant respectivement 2, 0 ou 1 pont disulfure). Le cycle macrolactame et la queue C terminale sont représentés respectivement en vert et bleu. Les acides aminés encombrants et les cystéines impliquées dans le piègeage stérique sont indiqués respectivement en magenta et en gras (Weber *et al.*, 1991).

VII.3.d. Mécanismes d'action des peptides antimicrobiens

Bien que le mécanisme d'action exact des peptides antimicrobiens reste un sujet de controverse- il est établi que ces peptides, de structure amphiphile, perturbent sélectivement la membrane cellulaire. La charge canonique permet aux peptides antimicrobiens d'interagir avec les charges négatives des phospholipides des membranes bactériennes. Cette interaction électrostatique peut se faire avec les lipopolysaccharides (LPS) des bactéries gram-négative ou avec le peptidoglycane des bactéries gram-positives (Epanand et Vogel, 1999). Après leur fixation, les peptides antimicrobiens s'insèrent aux phospholipides de membrane bactérienne via un des trois modèles 'douve de tonneaux' (barrel stave), 'pores toroïdaux' (toroidal-pore)

ou 'tapis' (carpet). Récemment, d'autres mécanismes d'action ont été proposés et dans lesquels les peptides antimicrobiens n'interagissent pas avec la membrane cytoplasmique. Dans ce cas, les peptides antimicrobiens agiront plutôt au niveau du cytoplasme en inhibant la synthèse des acides nucléiques et/ou des protéines, ou en entravant l'activité enzymatique bactérienne (**Hammami, 2009**).

Chapitre II : Les bactéries lactiques

Chapitre II.

Les bactéries lactiques

I. Introduction

Les bactéries lactiques ont été retrouvées dans des sédiments datant de 2,75 milliards d'années bien avant l'apparition d'oxygène dans l'atmosphère, ce qui pourrait expliquer leur caractère anaérobie. De plus, des études sur la phylogénie bactérienne mentionnent leur apparition avant celle des cyanobactéries (**Quiberoni et al., 2001**).

A la fin du 19^{ème} siècle, des chercheurs se sont penchés sur la fermentation du lait pour trouver la cause de sa coagulation acide. **Storch (1890)**, **Conn (1889)** et **Weigmann (1896)** ont conclu que la présence de bactéries lactiques est responsable de l'acidification du lait et de la maturation de la crème (**Ouadghiri et al., 2005**).

Historiquement, les genres *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* et *Streptococcus* ont été les premiers à être décrits. D'un point de vue technologique, les genres cités ci-après sont considérés comme les principaux des bactéries lactiques : *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, et *Weissella* (**Axelsson, 2004**).

II. Habitat

Les bactéries lactiques sont des microorganismes ubiquitaires susceptibles d'être retrouvés dans tous types d'habitat. Elles sont présentes à l'état libre dans l'environnement ou vivent en association avec un hôte, tel que l'Homme ou l'animal, dans un écosystème bactérien comme le tractus gastro-intestinal ou génital des mammifères ou des canaux galactophores (**Dellaglio et al., 1994**).

Dans l'environnement, les bactéries lactiques sont souvent retrouvées dans le lait et ses dérivés (lait fermenté, fromages, ...). Les différentes espèces de *Lactobacillus*, *Lactococcus lactis* (*Lc. lactis*) et/ ou *Lc. garvieae*, les plus rencontrées dans le lait et le fromage, sont communément utilisées comme ferments (« starter culture ») par l'industrie agroalimentaire pour la production de produits laitiers.

Les bactéries lactiques peuvent vivre en symbiose entre elles et avec un hôte. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques telles que *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Weisseilla*. Par ailleurs, l'appareil génital chez la femme est principalement colonisé par des bactéries lactiques, telles que *Lactobacillus*, aux quelles il apporte des nutriments comme le glycogène. En acidifiant le milieu, ces bactéries apportent une protection contre des pathogènes tel que *Trichomonas vaginalis* (*T. vaginalis*), pathogène responsable de la trichomonase vaginale (**Björkroth et Holzapfel, 2006, Ruiz et al., 2009**) et/ ou *Candida albicans* à l'origine de la vulvo-vaginite (**Falagas et al., 2006, Pirota et al., 2004**).

III. Caractéristiques morphologiques et biochimiques

Le groupe des bactéries lactiques a été défini par **Orla-Jensen (1919)** et réunit plusieurs genres caractérisés par leur capacité à fermenter les glucides en produisant de l'acide lactique. Ce sont des coques ou bâtonnets Gram positif, généralement immobiles et non sporulés. Il existe d'autres bactéries produisant de l'acide lactique mais qui ne sont pas considérées comme faisant partie du groupe des bactéries lactiques. C'est le cas, par exemple, de *Bacillus* et *Sporolactobacillus* qui sont des bactéries Gram (+) sporulées (**Axelsson, 2004**). Les bactéries lactiques sont anaérobies mais aéro-tolérantes, et ne possédant ni catalase (certaines souches possèdent une pseudo-catalase), ni nitrate-réductase, ni cytochrome-oxydase (**Ouadghiri et al., 2005**).

Le contenu en GC de leur ADN varie de 33 à 54%, ce qui les classe dans les bactéries à faible pourcentage de GC (**Muto et Osawa, 1987**). Elles sont de métabolisme chimio-organotrophes, ce qui signifie qu'elles utilisent comme source énergétique des substances hydrocarbonées telles que les sucres, les alcools et les acides organiques. Elles possèdent souvent des exigences nutritionnelles complexes en terme d'acides aminés, de peptides, de

vitamines, de sels, d'acides gras et de sucre (**Dellaglio et al., 1994**).

Elles produisent l'acide lactique comme produit final principal de la fermentation des hydrates de carbone. La fermentation est dite homolactique si l'acide lactique est le produit majoritairement formé (> 85 % du pyruvate converti en lactate) et hétéro-lactique si d'autres composés, tels l'acide acétique, l'éthanol, le formiate et le CO₂, sont synthétisés (**Salvetti et al., 2013**).

Elles survivent dans un milieu à faible Aw, et résistent à l'éthanol (10 – 15 % éthanol) et au CO₂.

En général, les bactéries lactiques ont des besoins complexes en facteurs de croissance tels que vitamine B, acides aminés, peptides, bases puriques et pyrimidiques. Les milieux de culture sont complexes et dits "riches". Il est donc difficile d'obtenir de bons milieux sélectifs. Seul l'abaissement du pH sera souvent utilisé comme agent de sélection. Les bactéries lactiques tolèrent en effet des pH acides (pH = 5 et parfois moins). A ces pH, et à *fortiori* pour des pH inférieurs, beaucoup de bactéries communes ont leur croissance inhibée. Ces propriétés sont utilisées en agro alimentaire pour transformer la matière et empêcher le développement de la plupart des bactéries d'altération ou des pathogènes. Il apparaît donc que les produits fermentés puissent être considérés comme "à faible risque" vis-à-vis des pathogènes courants. Cependant, il n'est pas exclu que des souches particulières d'une espèce de bactérie indésirable puissent se développer. D'autres microorganismes sont également connus pour se développer à pH acide, comme de nombreuses levures et moisissures (**Nielsen et al., 2008 ; Sachindra et al., 2005**).

IV. Classification

La première classification des bactéries lactiques a été établie en 1919 par **Orla- Jensen**. Elle est basée sur les caractéristiques observables telles que les propriétés morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les marqueurs chimiotaxonomiques, comme la composition des acides gras et les constituants de la membrane cellulaire, ont été également utilisés pour la classification (**Krieg, 2001**).

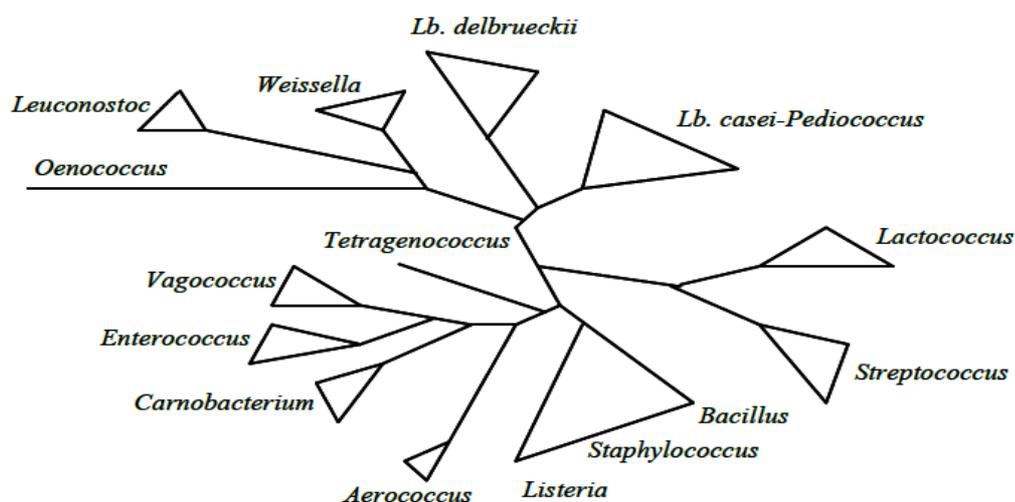


Figure 12 : Arbre phylogénique des bactéries lactiques et comparaison avec les genres *Aerococcus*, *Bacillus*, *Listeria* et *Staphylococcus* d'après **Axelsson (2004)**.

La classification des levures, des bactéries, des virus et des protistes est basée sur la taxonomie polyphasique. Ce terme est apparu dans les années 70 défini par Colwell (**Colwell, 1970**) et se réfère à une taxonomie basée sur un large ensemble de critères regroupant les caractéristiques écologiques, phénotypiques, biochimiques et génétiques (**Pot, 2008**). De nombreuses classifications des bactéries lactiques ont été proposées. Parmi elles, figure la classification selon la composition de la paroi cellulaire bactérienne (**de Ambrosini et al., 1996**), incluant la nature des acides gras, tels que l'acide lactobacillique ($C_{19:0}$) et les acides gras insaturés ($C_{14:0}$, $C_{16:0}$, $C_{18:0}$) qui la composent (**Gilarová et al., 1994**).

D'après **Ludwig et al. (2008)**, le phylum *Firmicutes* comprend trois classes : *Bacilli*, *Clostridia* et *Erysipelotrichi*. Appartenant à la classe *Bacilli*, les bactéries lactiques sont divisées en trois familles :

- ✓ Famille des *Lactobacillaceae* comportant les *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* et *Pediococcus*.
- ✓ Famille des *Leuconostocaceae* contenant les *Leuconostoc*, *Oenococcus* et *Weissella*.
- ✓ Famille des *Streptococcaceae* comprenant les *Streptococcus*, *Lactococcus* et *Lactovum*.

Une autre classification, basée sur les différents modèles de fermentation du glucose définit 3 groupes (**McLeod et al., 2008**). Le groupe I renferme les bactéries réalisant

exclusivement l'homofémentation. Ce groupe comporte majoritairement des *Lactobacillus*. Le groupe II inclut les bactéries réalisant l'hétérofémentation et regroupe les *Leuconostoc*, les *Oenococcus*, les *Weissella* et quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus*. Le groupe III regroupe quant à lui quelques espèces appartenant au genre *Lactobacillus* et la majorité des espèces appartenant au genre *Enterococcus*, *Lactococcus* et *Streptococcus*. Ce groupe présente une position intermédiaire entre le groupe I et II réalisant ainsi l'homofémentation ou l'hétérofémentation selon les conditions environnementales (**McLeod et al., 2008**).

Les études d'hybridation ADN ÷ ADN, puis des structures et des séquences d'ARN ribosomiaux sont aussi devenues depuis quelques années des éléments essentiels permettant l'identification et ainsi la classification taxonomique des bactéries lactiques (**Vandamme et al., 1996**). Une étude basée sur la comparaison des séquences d'ARN 16S et/ ou 23S des bactéries lactiques propose une classification en 3 groupes restreinte à certaines bactéries lactiques : groupe des *Leuconostoc*, groupe des *Lactobacillus delbrueckii* (*Lb. delbrueckii*) et groupe des *Lb. casei-Pediococcus* (**Rodrigues et al., 1991**).

Le tableau 9 présente les principaux genres de bactéries lactiques et les caractéristiques physiologiques qui forment la base de la classification et de l'identification.

Tableau 9 : Principaux genres de bactéries lactiques (Matamoros , 2008).

Genre	Forme de la cellule	Type de fermentation	Configuration de l'acide lactique	Espèce type
<i>Aerococcus</i>	Coques	Homoférentaire		<i>Ac. viridans</i>
<i>Carnobacterium</i>	Bacilles	Hétéroférentaire	L(+)	<i>Cb. divergens</i>
<i>Enterococcus</i>	Coques	Homoférentaire	L(+)	<i>Ec. faecalis</i>
<i>Lactobacillus</i>	Bacilles	Homo ou hétéroférentaire	D(-), L(+) ou D/L	<i>Lb. delbrueckii</i>
<i>Lactococcus</i>	Coques	Homoférentaire	L(+)	<i>Lc. lactis</i>
<i>Leuconostoc</i>	Coques	Hétéroférentaire	D(-)	<i>Ln. mesenteroides</i>
<i>Oenococcus</i>	Coques	Hétéroférentaire	D(-)	<i>Oe. oeni</i>
<i>Pediococcus</i>	Coques	Homoférentaire	D/L ou L(+)	<i>Pc. damnosus</i>
<i>Streptococcus</i>	Coques	Homoférentaire	L(+)	<i>Sc. salivarius</i>
<i>Tetragenococcus</i>	Coques	Homoférentaire	L(+)	<i>Tc. halophilus</i>
<i>Vagococcus</i>	Coques ovoïdes	Homoférentaire	L(+)	<i>Vc. fluvialis</i>
<i>Weissella</i>	Petits bacilles	Hétéroférentaire	D/L ou D(-)	<i>We. viridescens</i>

V. Identification et typage des bactéries lactiques

L'approche classique de la taxonomie des bactéries lactiques a été toujours basée sur les caractéristiques morphologiques, métaboliques et physiologiques. Cette identification a été élargie pour inclure des marqueurs chimiotaxonomiques, l'analyse des protéines totales de la cellule et autres caractéristiques de la cellule (**Ouadghiri *et al.*, 2005**).

Des tests physiologiques simples, tels que la croissance à différentes températures, la tolérance aux acides et au sel ainsi que la production de gaz sont utiles pour la différenciation des genres (**Axelsson , 2004**).

Une identification fiable est dépendante de l'information génotypique. Les techniques basées sur l'analyse de l'ADN permettent une meilleure différenciation des micro-organismes à différents niveaux, allant du genre jusqu'à la souche en fonction des méthodes utilisées. Le séquençage direct du gène d'ARNr 16S est l'une des méthodes les plus puissantes pour l'identification en une seule étape d'une souche inconnue. Les méthodes génotypiques tels que le séquençage de l'ADNr, ribotypage, Random Amplified polymorphic DNA (RAPD), rep-PCR fingerprinting, Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP), électrophorèse en champ pulsé (PFGE) de l'ensemble de l'ADN chromosomique digéré constituent aujourd'hui une partie importante de la taxonomie moderne des bactéries lactiques (**Chao *et al.*, 2013; Mancini *et al.*, 2012**).

Le ribotypage a été particulièrement utilisé pour révéler les hétérogénéités entre des souches à faible homologie. Le pouvoir discriminatoire de cette méthode dépend du nombre et du type de sondes d'oligonucléotides et enzymes de restriction utilisées.

La variation du nombre et de la taille des plasmides hébergés par des souches de la même espèce, est utile pour typer les bactéries lactiques car la plupart des souches de ce groupe semblent contenir plusieurs plasmides (**Ouadghiri *et al.*, 2005**).

VI. Propriétés fonctionnelles et technologiques recherchées

L'utilisation des bactéries lactiques pour une application industrielle donnée est déterminée par leurs propriétés fonctionnelles et technologiques. Celles-ci recouvrent les propriétés suivantes : activité acidifiante, propriétés enzymatiques (activité protéolytique, peptidasique et lypolytique), production de métabolites d'intérêt telle que la peroxyde d'hydrogène, les acides organiques et les bactériocines.

D'autres qualités ont depuis été associées aux bactéries lactiques lorsqu'elles sont associées aux produits alimentaires comme l'augmentation des valeurs nutritionnelles des aliments, la réduction de la formation de produits toxiques et la propriété de probiotique. En plus de la propriété de bioconservation, plusieurs propriétés ont été attribuées aux bactéries productrices de bactériocines telles que la diminution des gaz dus à la fermentation ainsi qu'à l'amélioration du goût et de la qualité du produit fini (**Makhloufi, 2011**).

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des EPS joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés (**Welman et al., 2003**). Ces composés polymères sont généralement considérés comme des agents épaississants naturels en industrie alimentaire. Les *Lb. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés en tant que starters fonctionnels dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis (**Durlu-Özkaya et al., 2007**). L'utilisation des EPS produits par les souches *Lactococcus lactis* ssp. *cremoris* est très prometteuse pour la structure et la viscosité des produits laitiers fermentés (**Ruas-Madiedo et al., 2005**).

Les bactéries probiotiques peuvent être décrites comme étant «un supplément alimentaire microbien qui peut affecter favorablement l'animal hôte en améliorant sa flore intestinale. Les produits contenant des bactéries probiotiques peuvent avoir un effet prophylactique et ainsi prévenir un déséquilibre de la flore intestinale ou un effet thérapeutique et rétablir l'équilibre de la flore intestinale lorsqu'il est perturbé. Les bénéfices potentiels des probiotiques vont de la suppression de l'activité de certains pathogènes à l'amélioration de l'utilisation du lactose, de la réduction du cholestérol sanguin et du niveau de substances carcinogènes, l'inactivation de composés toxiques ainsi que la stimulation du système immunitaire; donc ces micro-organismes sont bénéfiques pour la santé de l'hôte (**Ninane et al., 2009**).

VII. Propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques

Les propriétés antimicrobiennes des bactéries lactiques peuvent être associées à de nombreux éléments. Elles résultent de l'effet combiné de différents facteurs biologiques provenant de leurs activités métaboliques.

Les produits principaux du métabolisme des bactéries lactiques sont les acides organiques qui sont produits soit par la voie homofermentaire, soit par la voie

hétérofermentaire. Grâce à cette production d'acides organiques, les bactéries lactiques diminuent le pH du milieu dans lequel elles se multiplient en inhibant une partie de la flore qui s'y développe. Leur compétitivité est améliorée étant donné leur grande tolérance aux pH bas extra et intracellulaires. Outre la diminution du pH du milieu, l'effet antagoniste des acides organiques résulte de l'action de leur forme non dissociée. En effet, la forme non dissociée de l'acide peut traverser passivement la membrane et acidifier le cytoplasme par libération du proton, ce qui affecte le métabolisme cellulaire en inhibant certaines fonctions

Les bactéries lactiques ne possèdent pas de catalase typique contenant un noyau hème pour dégrader le peroxyde d'hydrogène en oxygène et en eau. Il peut s'accumuler et être inhibiteur de différents micro-organismes par l'oxydation des lipides membranaires et la destruction des structures des protéines cellulaires fonctions (**Kostinek et al., 2005**).

Le dioxyde de carbone est formé pendant la fermentation hétéro lactique et crée un environnement anaérobie qui inhibe les microorganismes aérobies. L'accumulation de dioxyde de carbone dans la bicouche lipidique peut causer un dysfonctionnement de la perméabilité ce qui peut inhibées la développent de souche pathogènes (**Ammor et al., 2006**).

Le diacétyl ($C_4H_6O_2$) est synthétisé par différents genres de bactéries lactiques comme *Lactococcus* sp, *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. et *Pediococcus* sp., il un des composants aromatiques essentiels du beurre. Il a des propriétés antimicrobiennes qui sont dirigées contre les levures, les bactéries Gram-négatif et les bactéries Gram-positif. Les concentrations nécessaires à l'obtention d'une inhibition sont de l'ordre de 100 ppm, et sont supérieures à celles présentes dans le beurre et susceptibles de provoquer son arôme (**Dortu et al., 2008**).

VIII. Les bactériocines : peptides antibactériens produits par les bactéries à Gram positif selon la voie ribosomique

VIII.1. Introduction

Les micro-organismes sont une source importante de peptides antimicrobiens et au fur et à mesure qu'un grand nombre de structures sont élucidées, il apparaît de plus en plus clair que beaucoup sont des peptides hautement modifiés contenant de nombreux motifs chimiques originaux et disposant d'un grand degré de diversité structurale. Chez les procaryotes, si le

rôle de ces peptides et protéines se révèle multiple, leur fonction première malgré tout est une fonction de défense. En effet, comme chez les eucaryotes, ces peptides et protéines empêchent par leur caractère antibiotique, la prolifération de micro-organismes externes ou internes à leur écosystème naturel (**Riley et Gordon, 1999 ; Riley et Wertz, 2002a,b; Riley et al., 2003**). Ils permettent ainsi de stabiliser un équilibre de la flore microbienne dans un écosystème donné. Des études sur l'origine biosynthétique des peptides antimicrobiens montrent qu'il faut clairement différencier les peptides antibiotiques "classiques" (**gramicidines, polycétides**) synthétisés par des complexes enzymatiques multifonctionnels, de ceux synthétisés de façon ribosomique. Parmi cette dernière classe de peptides antimicrobiens, nous pouvons citer les bactériocines et les microcines.

D'après **Hancock et Chapple**, les peptides antimicrobiens se répartissent en deux catégories : ceux issus d'une synthèse non ribosomique, et ceux dit « naturels », selon le terme utilisé par les auteurs, issus d'une synthèse ribosomique (**Hancock et Chapple, 1999 ; Nolan et Walsh, 2009**). Cependant les peptides antimicrobiens peuvent aussi provenir du clivage protéolytique de protéines naturellement présentes dans l'organisme.

VIII.2. Définition

Le terme **bactériocine** regroupe en fait tous les peptides antimicrobiens d'origine bactérienne issus de la voie ribosomique. La première définition (**Tagg et al., 1976**) les désigne en effet comme des substances protéiques présentant une activité bactéricide dirigée contre des espèces phylogénétiquement proches (**Jack et al., 1995; Klaenhammer, 1988, 1993; Sablon et al., 2000**). Dans la pratique, les bactériocines désignent aujourd'hui le plus souvent les peptides antimicrobiens produits par les bactéries à Gram positif et plus particulièrement les bactéries lactiques.

Les principales espèces bactériennes impliquées dans la synthèse de bactériocines sont des membres des genres *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Bifidobacterium* et *Carnobacterium*. Un grand nombre de ces bactéries sont connues pour leur contribution au développement des arômes dans les aliments et au ralentissement de leur détérioration. Ainsi, elles sont largement utilisées dans l'industrie alimentaire. Les plus utilisées sont les bactériocines de la classe I (lantibiotiques) et en particulier la nisine, et celles de la classe IIa.

VIII.3. Classification

Afin de regrouper les peptides antimicrobiens des bactéries à Gram positif, plusieurs classifications ont été proposées dans différentes revues (Nes *et al.*, 2007 ; Cotter *et al.*, 2005; Daw et Falkner, 1996; Diep et Nes, 2002; Heng et Tagg, 2006; McAuliffe *et al.*, 2001), toutes inspirées de la classification établie en 1993 par Klaenhammer pour les bactériocines de bactéries lactiques (Klaenhammer, 1993).

La classification suivante (Tableau 10) est proposée par Bastos *et al.* (Bastos *et al.*, 2009) d'après les classifications de Klaenhammer en 1993 et de Heng en 2006 (Heng et Tagg, 2006).

Tableau 10 : Classification des bactériocines produites par les bactéries à Gram positif (Bastos *et al.*, 2009).

Classification	Caractéristiques	Sous-classe	Exemples
Classe I (lantibiotiques)	Peptides contenant des acides aminés modifiés	Type A (linéaire) Type B (globulaire) Type C (multicomposant)	Pep5, Epidermine, Nukacine ISK-1 Mersacidine Staphylococcine C55
Classe II	Peptides contenant des acides aminés non modifiés	IIa (<i>pediocin-like</i>) IIb (multicomposant) IIc (divers)	Pédiocine PA-1 Auréocine A70, Lactacine F Auréocine A53, Lactococcine A, Divergicine A
Classe III	Protéines sensible à la chaleur	Type IIIa (bactériolysines) Type IIIb (non lytique)	Lysostaphine Helvéticine J
Classe IV	Peptides cycliques	-	Entéroccine AS-48

➤ **Les bactériocines de classe I ou lantibiotiques**

Sont des peptides de faibles masses moléculaires (< 4 kDa), possédant des modifications post-traductionnelles complexes caractérisées par la présence de résidus modifiés de type lanthionine (Guder *et al.*, 2000; Sablon *et al.*, 2000). Cette classe est divisée en 2 sous-classes, A et B.

Une trentaine de lantibiotiques sont connus à ce jour. Ils ont été classés en deux sous-classes sur la base de leur origine biosynthétique, de la localisation des ponts thioéther et de leurs activités biologiques. Le principal représentant de la sous-classe A est la **nisine**, qui est couramment utilisée dans l'industrie alimentaire comme conservateur naturel sous le nom de

Nisaplin® (Delves-Broughton *et al.*, 1996) (Figure 13). Parmi les lantibiotiques les plus connus, on peut aussi citer la subtiline (Gross et Kiltz, 1973) et l'épidermine (Allgaier *et al.*, 1986). Ce sont des peptides cationiques d'une trentaine de résidus présentant des structures amphiphiles, allongées et flexibles.

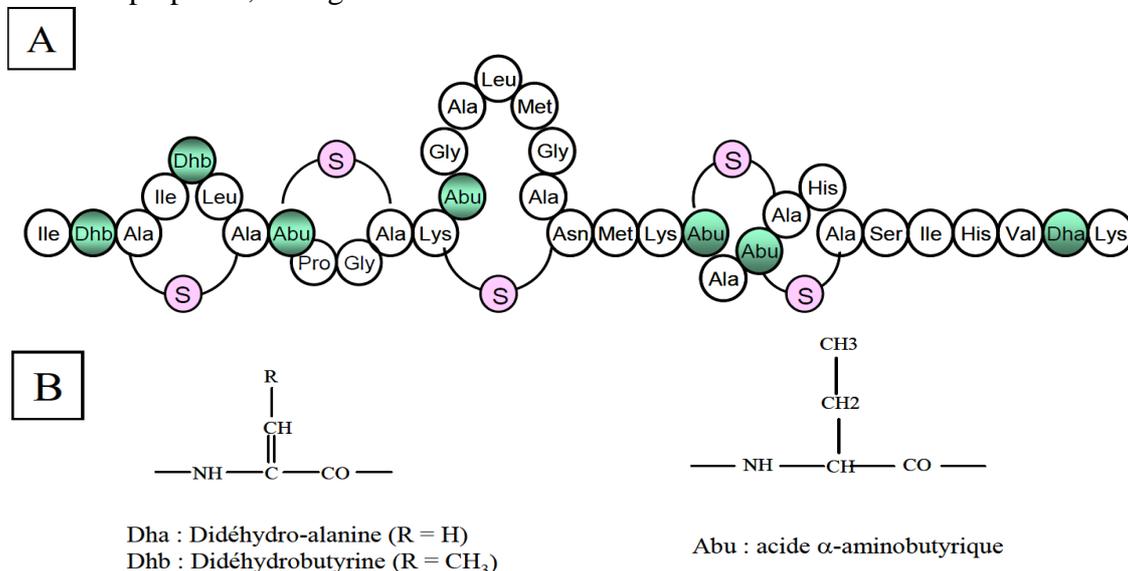


Figure 13. (A) Séquence de la nisine appartenant à la classe I des bactériocines. Les acides aminés modifiés (Dha, Dhb et Abu) sont en vert. Le pont thioéther est représenté en rose. **(B) Représentation des acides aminés modifiés (Petit, 2009).**

Contrairement à ceux de la sous-classe A, les lantibiotiques de la sous-classe B sont des peptides d'une vingtaine de résidus possédant une charge négative ou nulle, des structures globulaire, compactes et rigides, parmi lesquels figurent les **duramycines**, les **cynnamicines** (Fredenhagen *et al.*, 1990; Kaletta *et al.*, 1991) et la **mersacidine** (Prasch *et al.*, 1997).

Les lantibiotiques sont actifs contre de nombreuses bactéries pathogènes, comme *Listeria* ou *Salmonella*, responsables d'infections. Cette particularité permet aux lantibiotiques d'être utilisés comme conservateurs alimentaires (Cotter *et al.*, 2005).

Le système génétique impliqué dans la biosynthèse et la régulation de la biosynthèse des lantibiotiques est, le plus souvent, présent sous forme de groupes de gènes (clusters). Ces clusters ont été largement étudiés ces dernières années (Bierbaum et Sahl, 2009 ; Jack *et al.*, 1998).

Contrairement à un grand nombre de peptides antimicrobiens d'eucaryotes dont le mode d'action implique une interaction directe du peptide avec la membrane cytoplasmique des bactéries, entraînant une perturbation de sa perméabilité et la mort des micro-organismes, les lantibiotiques présentent des mécanismes d'action plus complexes et affectant d'autres cibles.

Les antibiotiques de la sous-classe B inhibent des fonctions enzymatiques par des interactions avec des substrats : citons comme exemple la mersacidine (Brotz *et al.*, 1995; Chatterjee *et al.*, 1992) et l'actagardine (anciennement appelé gardimycine) (Somma *et al.*, 1977), qui inhibent la biosynthèse du peptidoglycane en formant un complexe avec le lipide II (ce dernier assure le transport du peptidoglycane du cytoplasme à la paroi). La nisine, prototype des antibiotiques de la sous-classe A, possède un mode d'action double : elle interagit avec le lipide II, inhibant ainsi la biosynthèse du peptidoglycane, et forme également des pores hétéromoléculaires dans la membrane des bactéries, impliquant des monomères de nisine et des monomères de lipide II (Hsu *et al.*, 2004 ; Zacharof et Lovitt, 2012) (Figure 14). Ce mode d'action complexe et original explique la très grande efficacité de ce peptide antimicrobien actif à des concentrations nanomolaires.

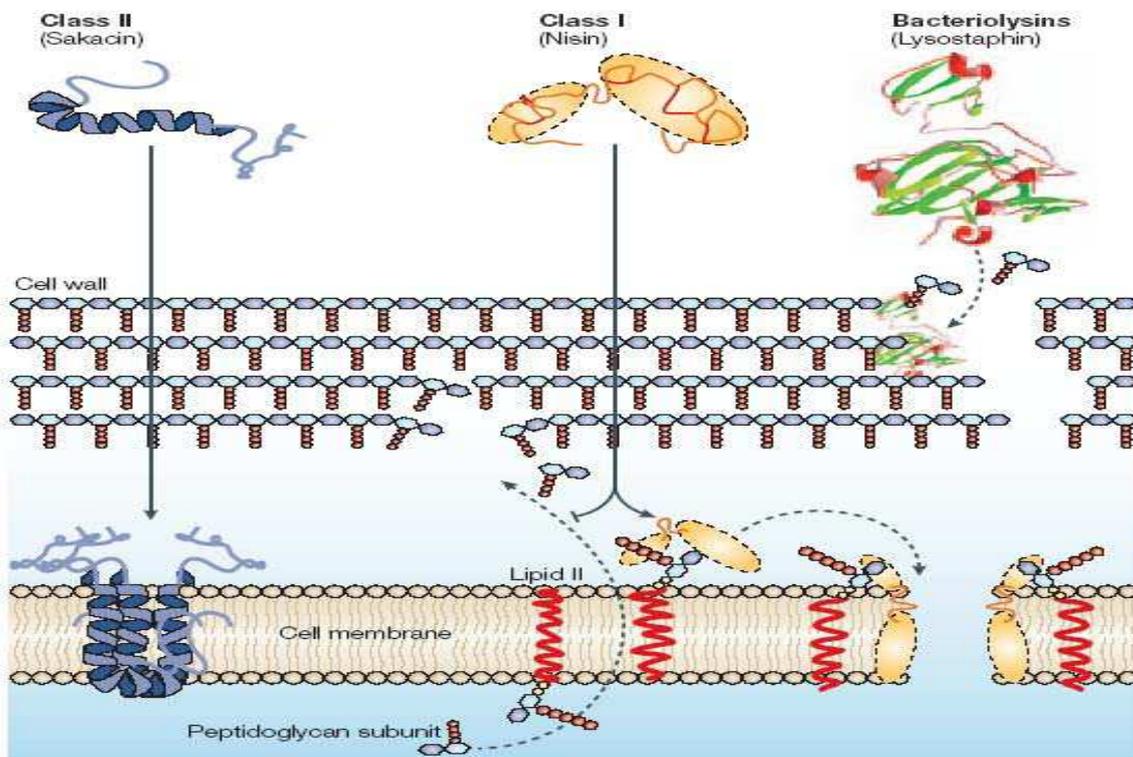


Figure 14. Mode d'action des bactériocines d'après Cotter *et al.* (2005).

Des bactériocines de classe I comme la nisine possèdent un double mode d'action. La nisine se lie au lipide II (transporteur du peptidoglycane du cytoplasme à la paroi cellulaire) empêchant la formation de la paroi et provoquant la mort de la bactérie. Elle utilise aussi le lipide II pour s'insérer dans la membrane et former des pores hétéromoléculaires.

Les bactériocines de classe II (comme la sakacine) ont en général une structure en hélice amphipathique, qui leur permet de s'insérer dans les membranes des bactéries, entraînant la dissipation du potentiel de membrane et la mort des bactéries.

Les bactériocines de la classe III (bactériolysines) comme la lysostaphine agissent directement au niveau de la paroi cellulaire entraînant la lyse et la mort de la cellule.

Certains antibiotiques n'appartiennent ni au type A ni au type B, comme la mutacine II (Woodruff *et al.*, 1998) (Figure 15). C'est un peptide de petite taille (3245 Da) qui contient une β -méthyllanthionine ainsi que deux lanthionines en plus d'un acide aminé didéshydrogéné. Ce lantibiotique, de par sa petite taille, ne peut pas tonner de pore au sein de la bicouche lipidique de la cellule cible. Ces peptides antibactériens agissent sur le potentiel de membrane ($A\Psi$) ainsi que sur le gradient de pH (ΔpH). De plus, ce peptide inhibe partiellement le transport de certains acides aminés (2- α -aminoisobutyrate et glutamate). Enfin, la mutacine II provoque la disparition du pool intracellulaire en ATP en inhibant l'ATP synthétase (Chikindas *et al.*, 1995; Jasniewski, 2008).

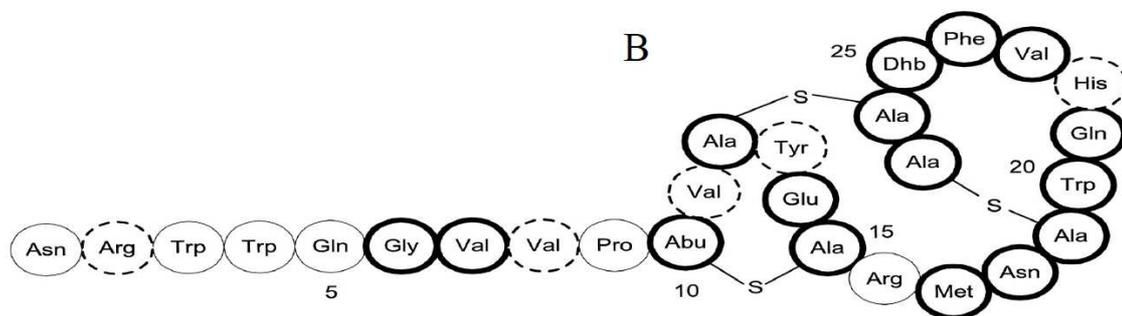


Figure 15: Structure de la mutacine II produite par *Streptococcus mutans* (Krull *et al.*, 2000).

➤ Les bactériocines de classe II

Cette classe regroupe les petites bactériocines (< 10 kDa) thermostables et ne subissant pas de modification post-traductionnelle : cependant elles sont généralement synthétisées sous forme d'un prépeptide qui sera mature lors de son excrétion dans le milieu extracellulaire. Le site du clivage protéolytique du peptide leader s'effectue généralement au niveau d'un doublet de glycine. Le mécanisme d'action de ces bactériocines est principalement fondé sur la perméabilisation de la membrane de la cellule cible. Les bactériocines peuvent interagir avec cette dernière. En effet, ces peptides sont hydrophobes, cationiques et adoptent une structure secondaire en hélice α en milieu apolaire (Fregeau Gallagher *et al.*, 1997 ; Wang *et al.*, 1999).

Cette classe de bactériocines comprend une telle variété de structures, que leur classification comporte plusieurs sous-classes : IIa, IIb, IIc et IId (Gray *et al.*, 2006; Cotter *et al.*, 2005).

- **Les bactériocines de classe IIa**

Sont des peptides caractérisés par une séquence consensus en partie *N*-terminale et une activité anti-*Listeria* ((Makhloufi, 2011 ; Nissen-Meyer, 2009 ; Henderson *et al.*, 1992 ; Drider *et al.*, 2006). Leur principal représentant est la pédiocine PA-1. Pour cette raison elles sont souvent nommées également bactériocines de type pédiocine ("pediocin-like bacteriocins"). Ces bactériocines sont produites, pour la plupart, par des bactéries lactiques et représentent le groupe de bactériocines de classe II le mieux étudié (Drider *et al.*, 2006). Depuis la découverte de nombreuses bactériocines pendant les années 90, telles que la curvacine A (Tichaczek *et al.*, 1993)/sakacine A (Axelsson et Holck, 1995), la leucocine A (Hastings *et al.*, 1991), la mésentéricine Y105 (Fleury *et al.*, 1996), la pédiocine PA-1 (Henderson *et al.*, 1992) et la sakacine P (Hühne *et al.*, 1996), de nombreuses nouvelles bactériocines ont été découvertes et sont régulièrement découvertes, comme la mundticine L (Feng *et al.*, 2009) et l'avicine A (Birri *et al.*, 2010).

- **Les bactériocines de classe IIb**

Communément appelées «two-peptides», dont l'activité antimicrobienne optimale nécessite la présence des deux peptides complémentaires, le plus souvent en quantité équimolaire (Oppegård *et al.*, 2007). Ils peuvent être actifs individuellement mais une synergie d'action est observée lorsqu'ils sont associés, comme par exemple pour l'entérocin L50A/L50B (Cintas *et al.*, 1998). Ces peptides peuvent également être inactifs individuellement ; seul un mélange des deux composants permet d'observer une activité antibactérienne, comme c'est le cas pour la plantaricine JK (Diep *et al.*, 1996).

- **Les bactériocines de classe IIc**

Sont des bactériocines cycliques, c'est-à-dire présentant une liaison peptidique intramoléculaire qui circularise le peptide (Kawai *et al.*, 2004). Par ailleurs, le terme circulaire a été associé à ces bactériocines pour les distinguer des peptides cycliques comme les polymixines, la cyclosporine A et la gramicidine S synthétisées par la voie des peptide-synthétases appelées NRPS (nonribosomal peptides synthetase) (Koglin et Walsh, 2009; Marahiel et Essen, 2009). Comme les autres bactériocines, les bactériocines circulaires agissent par la perméabilisation de la membrane cytoplasmique et la perturbation de la force protomotrice membranaire de la bactérie cible aboutissant à la mort cellulaire.

- **Les bactériocines de classe II_d**

Sont des peptides linéaires qui se distinguent des bactériocines de classe II_a (**Diep and Nes, 2002**): elles sont pour cette raison nommées aussi de type non-pédiocine ("non-pediocin-like"), ou encore "one-peptide bacteriocins".

Ce nouveau sous-groupe de bactériocines de classe II est représenté par la **bacthuricine F4** et la **thuricine 17**. Elles possèdent une similarité de séquence en partie *N*-terminale et sont produites par des bactéries appartenant au genre *Bacillus* (**Jung et al., 2011 ; Gray et al., 2006; Kamoun et al., 2005**).

➤ **Les bactériocines de classe III ou bactériolysines**

Cette classe de bactériocines est définie comme étant des peptides de hauts poids moléculaire (> 30 kDa) et thermosensibles. Peu de bactériolysines ont été caractérisées sur le plan biochimique comme la **lysostaphine** (**Simmonds et al., 1997**) ou l'**entérolysine A** (**Hickey et al., 2003**). Leurs mécanismes d'action se sont révélés différents de ceux des autres bactériocines, car leur activité antibactérienne implique l'hydrolyse d'une partie de la membrane externe. Ces bactériocines possèdent une région catalytique homologue à des endopeptidases en partie *N*-terminale, la partie *C*-terminale intervenant plutôt comme site de reconnaissance pour la cible (**Zacharof et Lovitt, 2012 ; Johnsen et al., 2005**).

➤ **Les bactériocines de classe IV**

Cette dernière classe regroupe les protéines couplées à une partie non protéique (lipide, oligosaccharide). Cette classe est très peu représentée voire éliminée (**Zhang et al., 2012; Drider et al., 2006**). *Leuconostoc paramesenteroides* OX produit une molécule antimicrobienne, la leucocine S, appartenant à cette classe. Cette protéine de haut poids moléculaire, thermosensible, perd totalement son activité vis-à-vis de *Lactobacillus sakei* en présence d' α -amylase, enzyme dégradant les glucides complexes. Un prétraitement de la souche cible avec cette même enzyme n'affecte pas l'activité de la leucocine S. Par conséquent, l' α -amylase agit directement sur la bactériocine et non sur un récepteur potentiel présent sur la souche sensible. Sa nature glycoprotéique a été confirmée lors d'une SDS-PAGE suivie d'une coloration au bleu Alcian (**Lewus et al., 1992**). Face à la complexité et à l'hétérogénéité de cette classification, certains auteurs ont proposé d'établir des classifications selon le genre producteur ; une classification pour les bactériocines produites par le genre *Enterococcus* est ainsi disponible (**Franz et al., 2007 ; Jasniewski, 2008**).

Problématique

Les maladies infectieuses demeurent la première cause de mortalité dans le monde. La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressif pour l'organisme hôte est donc toujours un sujet d'actualité.

Les actinomycètes représentent les principales sources de métabolites secondaires à activité anti cellulaire. Ce groupe produit plus de 3.000 antibiotiques à activité antibactérienne ou antifongique. Les actinomycètes sont aussi la source de substances anticancéreuses, antihelminthiques, insecticides, herbicides et de substances ayant des activités biologiques les plus diverses (immunosuppressive, immunostimulantes).

Le criblage a toujours été la voie essentielle pour parvenir à de nouvelles familles de molécules antimicrobiennes antibactériennes et antifongiques, à partir d'échantillons provenant des habitats les moins habituels qui peuvent être exploités pour la recherche de métabolites secondaires.

L'objectif de ce travail est:

- Le criblage de souches d'actinomycètes d'origine terrestre potentiellement productrices des substances antimicrobiennes et les souches retenues feront l'objet de l'isolement, l'extraction, la purification et la détermination de la structure des molécules bioactives ;

- Le criblage des bactéries lactiques et/ou leurs métabolites a partir de produits laitiers traditionnels; En effet ces ferments sont utilisés depuis des millénaires d'une façon empirique par de nombreuses populations, pour contrôler la prolifération et l'inhibition de souches bactériennes pathogènes actuellement devenues résistantes aux traitements usuels.

Dans cette contribution nous nous sommes plus intéressés à la caractérisation des bactéries actinomycétales et de leurs métabolites, les bactéries lactiques ont été traitées d'une manière assez restreinte et nous espérons les développer plus tard.

Matériel & méthodes

Chapitre I : Les actinomycètes

Chapitre I.

Les actinomycètes

I. Prélèvement des échantillons

Le travail porte sur la production des substances antimicrobiennes secrétées par des actinomycètes isolées à partir du sol. Dix huit échantillons sont prélevés de différents sites de wilayas de Tlemcen et de Laghouat (Tableau 11 et Figure 16).

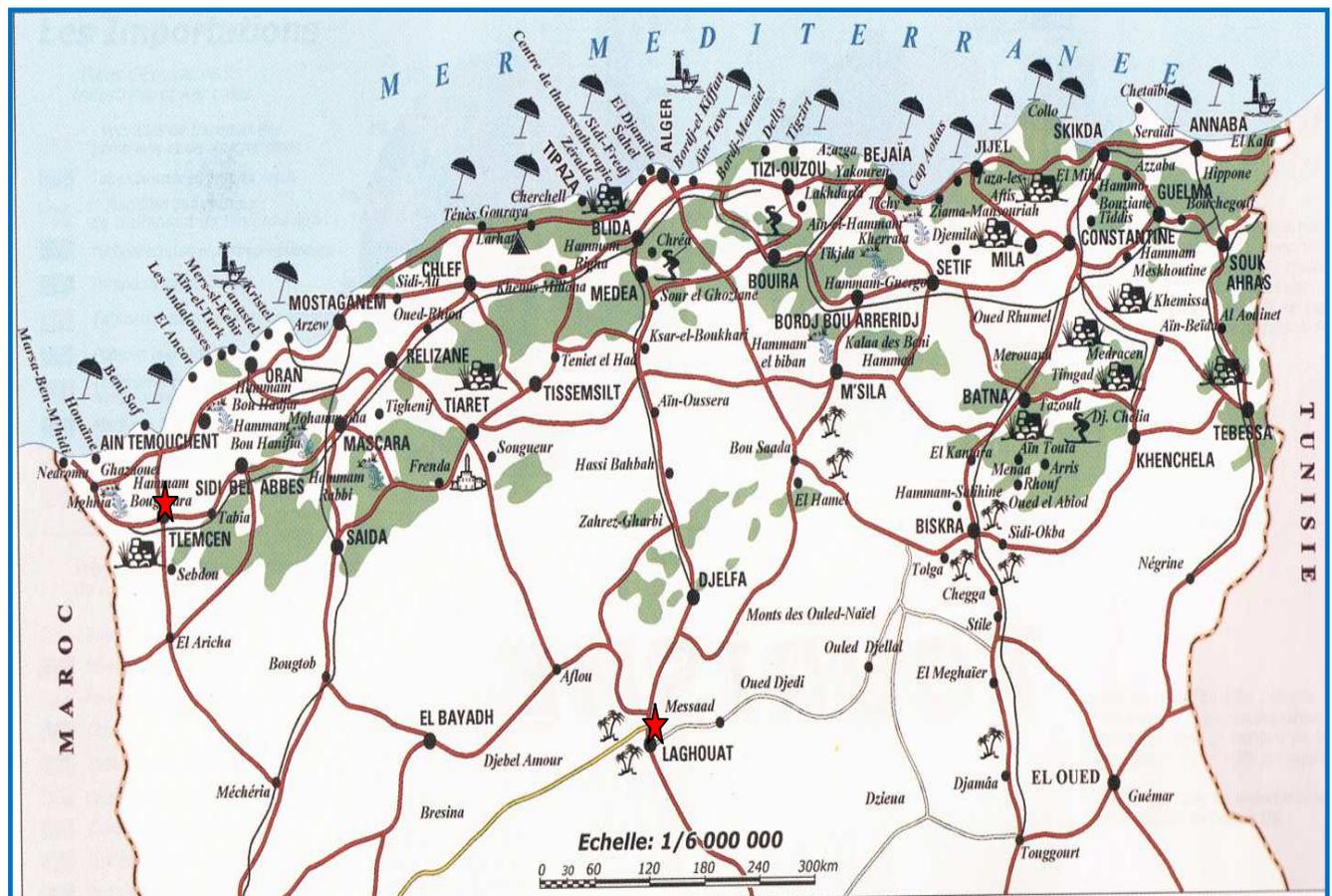
Les prélèvements à partir de la couche rhizosphérique ont été effectués pendant la période du juillet 2007 jusqu'au septembre 2008, de manière aléatoire et simple (Tableau 12).

A l'aide d'une grande spatule stérile, les cinq premiers centimètres de la couche superficielle du sol sont écartés (sauf pour le premier échantillon (E_{1H})), nous avons prélevé alors avec une petite spatule stérile dans la couche sous-jacente (entre 5 et 20 cm de profondeur) 20 à 200 g de terre qui sont placés dans un sachet stérile soigneusement fermé et transporté au laboratoire (**Kitouni, 2007; Abdelaziz, 2006**).

Les prélèvements du sol ont été réalisés dans des conditions d'asepsie après écartement des gros débris (pierres, racines, etc.). Ces échantillons ont été séchés à l'air ambiant et broyés dans un mortier pour éliminer les grumeaux de terre et faciliter l'isolement des souches d'actinomycétales.

Tableau 11: Situation géographique des stations d'échantillonnage.

Région	Altitude (mètres)	Latitude (N)	Longitude	Etage bioclimatique
Tlemcen	843	34° 52'	1° 18' Ouest	Semi-aride
Laghouat	824	33° 34'	2° 40' Est	Aride à Saharien



: Oasis



: Complexes balnéaires



: Zone d'échantillonnage

Figure 16: Carte d'Algérie montrant les régions d'échantillonnage (Djazairouna l'Atlas pratique de l'Algérie, 2004).

Tableau 12 : Origines et aspects des échantillons des sols prélevés.

<i>Échantillon</i>	<i>Région</i>	<i>Origine</i>	<i>Profondeur (cm)</i>	<i>Remarque</i>
E_{1H}	Wilaya de Tlemcen	Sol de Forêt 01 (Tlemcen)	5 premiers cm	Humus (matière organique : noir)
E₁		Sol de Forêt 01 (Tlemcen)	5 – 20	Sol fin brun noir
E₂		Sol de Forêt 02 (Tlemcen)	5 – 20	Sous forme de morceaux durs marron
E₃		Barrage de la Wilaya	5 – 20	Sol de calcaire, marron vert
E₄		Sol de Forêt 03 (Tlemcen)	5 – 20	Sol dur, des morceaux noir-marron-rouge
E₅		Sol de Forêt 04 (Aïn Fezza)	5 – 20	Sol marron
E_{6.1}		Sol d'Oued (Oued Chouli)	10 – 15	Couche homogène pâteuse rouge
E_{6.2}		Sol d'Oued (Oued Chouli)	10 – 20	Couche homogène pâteuse noire
E₇		Sol d'un Montagne rocheux	03 – 11	Sol marron-rouge
E₈		Sol d'un Montagne rocheux	05 – 16	Sol marron fin
E₉		Sol Montagneux	04 – 11	
E₁₀		Sol d'un Montagne rocheux	05 – 15	
E₁₁		Sol d'un Montagne rocheux	04 – 12	
E₁₂	Wilaya de Laghouat	Sol des Oasis d'une palmeraie (El Assafia)	05 - 13	Sol de palmiers dattiers
E₁₃		Sol des Oasis d'une palmeraie (El Assafia)	05 – 12	
E₁₄		Sol des Oasis d'une palmeraie (El Assafia)	05 - 18	
E₁₅		Sol des Oasis d'une palmeraie (El Assafia)	05 - 12	
E₁₆		Sol des Oasis d'une palmeraie (El Assafia)	08 - 16	
E₁₇		Oued M'Zi-Laghouat	05 - 20	Période sèche (absence d'eau)

II. Données physico-chimiques et pédologiques

Les analyses physico-chimiques et pédologiques des lieux de prélèvements (oasis, montagnes et oueds), ont été réalisées dans un but de voir la relation entre les microorganismes isolées et les caractéristiques de leurs écosystèmes (teneurs en matière organique, CaCO₃, conductivité : indicateur sur la salinité du sol, ...). Ces différentes analyses ont été effectuées au sein d'une entreprise publique : Laboratoire des Travaux Publics de l'Ouest (LTPO) à Tlemcen.

III. Isolement, purification et conservation des actinomycètes

Les ensemencements sont effectués par la méthode de suspension-dilutions. On met en suspension 5g du sol sec dans 45 mL d'eau physiologique stérile (NaCl 9 g.L⁻¹), ce qui représente la dilution 10⁻¹. Après homogénéisation au vortex, on réalise des dilutions décimales dans l'eau physiologique stérile jusqu'à 10⁻⁵ (**Bastide, 1986 ; Kitouni, 2007**), puis on étale 100 µl de chaque dilution à la surface des milieux de culture :

- Chitine-B vitamins medium (**Hayakawa et Nanomura, 1987**)
- Milieu **Olson (1968)** ;
- Milieu de Bennett (**Jones, 1949 ; Wakisaka, 1982 in Bastide, 1986**);
- Milieu ISP₂ (**Shirling et Gottlieb, 1966**) ;
- Gélose Trypticase de Soja (T.S.A) (**Krishnamurthi et Chakrabarti, 2013**) ;
- Plate Count Agar (P.C.A) (**Krishnamurthi et Chakrabarti, 2013**) ;
- Gélose Nutritive (G.N) (**Kim et al., 2013**).

Tous les milieux utilisés dans cette étude contiennent des antifongiques : le cycloheximide (50 µg/mL) et la nystatine (30 µg/mL) (**Williams et Davies, 1965 in Bastide, 1986**). Les solutions d'antifongiques sont préparées extemporanément en acétone (cycloheximide) et en eau (nystatine). Elles sont ajoutées aseptiquement aux différents milieux après stérilisation de ceux-ci.

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à 28±1°C pendant 2 à 4 semaines et examinées régulièrement. Les colonies présentant les critères des actinomycètes sont repiquées et purifiées sur les milieux Bennett ou T.S.A (**Bastide, 1986**). La conservation a été faite à +4°C dans des tubes en verre spécifiques (25x100) et à -20°C dans le glycérol à 20 % (v/v) (**Bastide, 1986 ; Kitouni, 2007**).

IV. Test d'activité antimicrobienne

IV.1. Méthode des cylindres d'agar

IV.1.1. Test d'activité antibactérienne

L'étude de la production des substances inhibitrices vis-à-vis des bactéries-tests à Gram positif et à Gram négatif a été faite après une incubation à $28\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 14 jours des souches d'actinomycétales qui sont ensemencées en stries serrées sur des boîtes de Pétri contenant le milieu Bennett gélosé.

Le tableau suivant donne l'origine de ces bactéries pathogènes.

Tableau 13 : Souches utilisées dans le test d'activité antimicrobienne.

Bactérie	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris)
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853	
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	
<i>Vibrio alginolyticus</i>		CIP 103336	

Pour chaque bactérie-test, un inoculum a été réalisé à partir d'une culture de 24 h, mis en suspension dans le milieu LB (Luria-Bertani Medium) stérile de telle manière à obtenir une densité optique entre 0,08 à 0,1 pour une longueur d'onde de 625 nm.

Le milieu M72 sur lequel nous avons effectué le test d'activité antibactérienne est préalablement ensemencé par une surcouche de milieu TSA faiblement gélosé et inoculé par les bactéries-tests en amas; par la suite, on dépose des cylindres d'agar de 6 mm de diamètre coupés à partir du milieu Bennett gélosé.

L'ensemble est placé dans un réfrigérateur à 4°C pendant 2 h pour permettre aux substances actives de diffuser dans la gélose, ensuite les boîtes sont incubées à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24 h. Les diamètres des zones d'inhibition apparues sont mesurés autour des cylindres d'agar (Shomura *et al.*, 1979; Saadoun et Al moumani, 1997; Petrosyan *et al.*, 2003 ; Boudjelal *et al.*, 2011). L'antibiotique ampicilline ($10\mu\text{g/mL}$) est utilisé comme témoin.

IV.1.2. Test d'activité antifongique

Le test de l'activité antifongique réalisé sur *Candida albicans* (origine MNHN) est effectué sur le milieu Sabouraud ensemencé par 1 ml d'une suspension de préculture. La nystatine (50µg/mL) et l'amphotéricine (50µg/mL) sont utilisées comme des témoins. L'incubation se fait 48 h à 30±1°C.

IV.2. Méthode des puits

Les souches d'actinomycètes sont mises en culture dans 5 ml du bouillon Bennett, puis incubées 7 jours à 28±1°C et agitées chaque 2 h.

Des puits de 6 mm de diamètre sont creusés dans les milieux tests préalablement ensemencés avec un germe cible. 100 µL de la culture d'actinomycète ont été déposés dans chaque puits (excepté pour *C. albicans* uniquement 50 µL). Après 30 min d'incubation à la température ambiante, les boîtes de Pétri sont incubées à 37±1°C pendant 24 h pour les bactéries et à 30±1°C pendant 48 h pour *C. albicans*. Les diamètres de la zone d'inhibition sont alors mesurés (Lemriss *et al.*, 2003 ; Valanarasu *et al.*, 2010).

V. Extraction et purification des molécules actives

En milieu solide, les souches d'actinomycètes sont cultivées sur le milieu Bennett à 28±1°C jusqu'à l'apparition des spores (environ une semaine). Nous avons procédé par la suite à l'ensemencement des Erlenmeyers à baffle contenant des bouillons M65 et Bennett pour la production de peptides antimicrobiens. Après environ une semaine d'incubation à 28±1°C et sous agitation de 160 rpm, une centrifugation a été faite à 4000 rpm pendant 20 min à 4°C. Ensuite, nous avons testé la présence des activités antibactériennes soit directement sur le surnageant brut, soit après des étapes d'extraction des molécules à partir du culot.

V.1. Extraction des molécules actives à partir du culot

Le mycélium est repris par quatre fois avec le mélange acétone-méthanol (50%-50%). Après la centrifugation pendant une nuit à 150 rpm et à 4°C, le mélange est filtré sur la laine de verre (Supelco, Glass Wool), puis le filtrat obtenu est dilué cinq fois par l'eau distillée et conservé à -20°C.

Les extraits actifs contre les bactéries cibles ont été fractionnés par la chromatographie d'exclusion en utilisant une colonne bien tassée de gel de silice 60 dont la taille des particules est comprise entre 0,035–0,070 mm fournie par Fluka. L'élution a été réalisée avec le méthanol et les différentes fractions obtenues ont été testées sur les souches pathogènes.

Les fractions actives ont été soumises à une étape de purification par HPLC en phase inverse en utilisant une colonne C18 (300 × 4,6 mm) à un débit de 0,5 ml/min, avec deux solvants : le solvant A (99,9% d'eau, 0,1% d'acide trifluoroacétique "TFA") et le solvant B (99,9% d'acétonitrile, 0,1% TFA). Le programme d'élution est le suivant : de 0 à 5 min (90% A, 10% B), de 5 à 30 min (50% A, 50% B), de 30 à 35 min (20% A, 80% B), de 35 à 50 min (10% A, 90% B) et de 50 à 60 min (90% A, 10% B). Les protéines sont détectées par UV à une longueur d'onde de 280 nm (Smaoui, 2010).

V.2. Extraction des molécules actives à partir du surnageant brut

Les surnageants bruts les plus actifs contre les bactéries cibles ont été passés sur cartouche SepPak[®] C18 (Waters Corp.) préalablement régénérée avec du méthanol et équilibrée avec H₂O-TFA 0,1 % pH 2. La cartouche a ensuite été lavée avec H₂O-TFA 0,1 % puis des éluions à 25 et 30 % d'ACN dans H₂O-TFA 0,1 % ont été effectuées. L'ACN contenu dans la fraction 30 % a été évaporé sous vide dans un concentrateur SpeedVac (Savant), puis la fraction a été lyophilisée. Les molécules contenues dans cette fraction ont été purifiées par HPLC en phase inverse C18 sur une colonne µBondapak (10 µm, 300 mm × 3.9 mm ; Waters Corp.) à l'aide d'un gradient de 0 à 60 % d'ACN dans H₂O-TFA 0,1 % en 30 min avec un débit de 1 ml/min. La purification a été suivie par mesure de l'absorbance à 226 nm (Duquesne, 2007).

V.3. Activité antibactérienne

Les tests antibactériens des fractions récupérées par HPLC ont été réalisés en milieu solide recouvert d'une gélose molle contenant 10⁷ bactéries/mL de la souche cible.

Des cultures de bactéries cibles ont été réalisées à partir de précultures de la nuit. Ces bactéries ont été cultivées jusqu'à ce que l'A_{620nm} soit comprise entre 0,2 et 0,4. Une suspension de la culture bactérienne a été mélangée à de la gélose molle de la manière suivante :

Le volume de la culture bactérienne (µL) inoculé à 10 ml de gélose molle = 30/ A_{620nm}.

10µL du produit à tester ont ensuite été déposés directement sur la gélose molle préalablement mélangée à la bactérie cible. Des contrôles positifs ont été réalisés en déposant 10 µL de chloramphénicol et de la Kanamycine (30 µg/ 10µL) sur le mélange gélose molle/ bactérie cible.

L'ensemble a ensuite été cultivé pendant la nuit. Les diamètres des zones d'inhibition de croissance ont été mesurés après 16 h de culture (**Makhloufi, 2011**).

V.4. Analyses chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse LC-MS

Les fractions issues du fractionnement des extraits de mycélium ont été analysées par LC-MS sur un spectromètre de masse de type électrospray – temps de vol (ESI-Qq-TOF) Q-STAR Pulsar (AB Sciex) muni d'une chaîne micro-HPLC U3000 (Thermo). Les échantillons ont été injectés sur une colonne Strategy C18-2 (150 × 1 mm, 5 µm, Interchim), sous un débit de 40 µL/min et un gradient H₂O/0,1% FA (solvant A) et ACN (solvant B) avec une augmentation linéaire de 0% B à 60% B en 30 min, puis de 60 % B à 100% B en 5 min. Le spectromètre de masse a été utilisé en mode positif sur la gamme de m/z 250 - 1300.

VI. Identification de souches d'actinomycétales actives

VI.1. Critères morphologiques

VI.1.1. Macromorphologie et caractères cultureux

L'aspect phénotypique de la colonie et les caractères cultureux sont déterminés sur les milieux Bennett et Amidon-caséine.

Les inoculums sont ensemencés par la méthode de stries. Après 7 et 14 jours d'incubation à 28±1°C, l'importance de la croissance et le développement du mycélium aérien sur chaque milieu sont observés. La pigmentation du mycélium aérien et celui du substrat (le dos de la colonie) et la présence de pigments diffusibles dans la gélose autre que les pigments mélanoïdes sont notés (**Shirling et Gottlieb, 1966**).

VI.1.2. Etude micromorphologique

VI.1.2.1. Observation au faible grossissement

Une colonie entière est placée sur une lame stérile et après élimination du maximum d'agar, elle est légèrement écrasée avec une lamelle et observée sous microscope optique (Grossissement ×40) (**Suzuki, 2001**).

VI.1.2.2. Observation au fort grossissement

Il s'agit d'une observation au microscope optique (Grossissement $\times 100$), après coloration de Gram. C'est une double coloration qui nous permet de connaître la forme, l'arrangement, la pureté ainsi que la nature biochimique de la paroi des cellules purifiées (Delarras, 2007 ; Duraipandiyar *et al.*, 2010).

VI.1.2.3. Observation au microscope électronique à balayage

Les observations au microscope électronique à balayage (MEB) sont réalisées au Service de Microscopie Électronique des laboratoires des Sciences de la Vie du Muséum National d'Histoire Naturelle grâce à la collaboration du docteur S. ZIRAH (UMR 7245 CNRS / MNHN 63, rue Buffon - 75005 PARIS).

A l'aide d'une pipette Pasteur stérile, les souches d'actinomycètes, qui développaient une activité antibactérienne importante sur les bactéries test, sont ensemencées sur milieu de sporulation SFM (Soya Flour Mannitol Agar) (Hobbs *et al.*, 1989). Les boîtes de Pétri sont incubées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$. La croissance des colonies et ses couleurs sont surveillées du premier jour jusqu'à la 3^{ème} semaine d'incubation.

Pour la préparation des échantillons pour la MEB, les colonies sont déposées dans une solution de glutaraldéhyde à 3% et incubées pendant 1h (ou toute la nuit) à 4°C . Après faire 3 lavages de 10 min dans chacun des solvants suivant : tampon phosphate, éthanol à 70%, éthanol à 95% et éthanol absolu, respectivement.

Avant l'observation microscopique des actinomycètes, on doit réaliser un point critique et une métallisation en Or des colonies.

*** Séchage par point critique**

Le sécheur par point critique K850 Point Drier permet le séchage des échantillons sans les détériorer. La chambre du sécheur est refroidie jusqu'à une température de -10°C puis est pressurisée en CO_2 . Une circulation de CO_2 liquide est générée de manière à remplacer tout l'éthanol. Lorsque tout le solvant est chassé, la chambre est chauffée : la température et la pression montent de manière à dépasser le point critique du CO_2 ($P_c = 74 \text{ bar}$, $T_c = 31^\circ\text{C}$). La chambre est dépressurisée tout en étant maintenue à une température supérieure à la température critique du CO_2 .

*** Métallisation**

Lorsque les échantillons sont déshydratés, on enlève chaque colonie de leurs petites cuves puis on les transferts sur des plots métalliques porte-objet. Les plots avec échantillons sont introduits dans l'enceinte du métalliseur dans laquelle on fait le vide. On laisse remonter un peu la pression en introduisant le gaz argon. On applique un puissant champ électrique entre une cathode et une anode qui porte les plots avec échantillon. Les électrons libres entraînés en spirale par un système magnétique entrent en collision avec les atomes d'Argon, ce qui génère des ions Ar⁺. Ces actions sont accélérées vers la cathode qu'ils bombardent avec assez d'énergie pour arracher des atomes d'or qui tombent en pluie sur la surface des échantillons, formant ainsi une fine couche conductrice.

*** Microscope électronique**

Le MEB utilisé est un Tescan de modèle VEGA II LSU. Un faisceau électronique très fin (sonde) balaie, point par point et ligne après ligne, la surface de l'objet. Diverses interactions entre les électrons incidents et la matière génèrent différents signaux utilisés pour construire des images tridimensionnelles de la surface des échantillons avec une résolution pouvant atteindre quelques nm.

VI.2. Critères physiologiques et biochimiques

VI.2.1. Production de pigments mélanoïdes

La mise en évidence de la production de ce pigment (pigment brun diffusible) est réalisée par la culture de la souche sur milieu gélosé ISP₆. Les boîtes sontensemencées en stries serrées et la production est appréciée après 2 et 4 jours d'incubation à 30±1°C. La pigmentation des milieuxensemencés est comparée avec celle du milieu stérile incubé dans les mêmes conditions (**Shirling et Gottlieb, 1966; Margalith, 1992**).

VI.2.2. Hydrolyse de l'amidon

La souche estensemencée sur le milieu gélose nutritif contenant 1 % (P/V) d'amidon soluble, après 14 jours d'incubation à 30±1°C, la culture est recouverte d'une solution de Lugol. L'hydrolyse de l'amidon est mise en évidence par l'absence de coloration autour des colonies. Les zones contenant de l'amidon se colorent en brun (**Geraldine et al., 1981**).

VI.2.3. Hydrolyse de la caséine

La souche est ensemencée sur milieu gélosé contenant de 2 à 5 % (P/V) de lait écrémé. L'apparition des zones claires autour des colonies après 7 à 14 jours d'incubation à 30±1°C témoigne l'hydrolyse de la caséine (**Staneck et Roberts, 1974; Geraldine et al., 1981**).

VI.2.4. Hydrolyse de la gélatine

La souche est cultivée sur milieu gélose nutritif contenant 0,4 % (P/V) de gélatine pendant 14 jours à 30±1°C. Les zones où la gélatine n'est pas dégradée s'opacifient lorsqu'une solution de chlorure mercurique est ajoutée. Les zones claires correspondent aux zones de l'hydrolyse (**Geraldine et al., 1981**).

VI.2.5. Action sur le lait écrémé

Des tubes contenant une solution de 10 % (P/V) de lait écrémé en poudre dans de l'eau physiologique sont ensemencés puis incubés à 30±1°C. Des observations régulières pendant 14 jours permettent de noter la coagulation et la peptonisation (digestion totale) du lait provoquées par la souche (**Williams et Cross, 1971**).

VI.2.6. Tolérance au chlorure de sodium

Ce test est réalisé en milieu bouillon nutritif avec 0,7 % (P/V) de glycérol, réparti à raison de 10 ml par tube et contenant des concentrations croissantes de chlorure de sodium (0, 3, 5, 6, 7, 9 et 10 % P/V). 10 tubes de chaque concentration sont préparés. Après ensemencement, les tubes sont incubés à 30±1°C avec agitation.

Le développement de la souche dans les différents tubes est observé après 14 et 28 jours d'incubation. La tolérance maximale au chlorure de sodium correspond à la dernière concentration présentant encore une croissance (**Geraldine et al., 1981**).

VI.2.7. Croissance à différentes températures des souches représentatives

Les souches actives sont ensemencées sur le milieu Bennett gélosé, après incubation pendant 21 jours, la croissance est estimée visuellement à 5°C, 30°C, 37°C et 55°C (±1°C) (**Chun et al., 1998**).

VI.2.8. Sensibilité aux antibiotiques

Sur le milieu Mueller Hinton, la souche d'actinomycétale est ensemencée en surface. Les disques d'antibiotiques (tableau 14) sont déposés sur la surface de la gélose puis placés dans un réfrigérateur à $4\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 2 h. La lecture est effectuée après 72 h d'incubation à $30\pm 1^\circ\text{C}$. La résistance est considérée comme positive lorsque aucune zone d'inhibition n'est observée (**Chun et al., 1998; Monciardini et al., 2003**).

Tableau 14 : Différents antibiotiques utilisés dans l'antibiogramme.

Antibiotique	Charge ($\mu\text{g}/\text{disque}$)
Erythromycine (E)	15
Ampicilline (AM)	10
Acide nalidixique (NA)	30
Tétracycline (TE)	30
Pénicilline (P)	6
Amoxicilline (AMX)	25

L'interprétation de l'antibiogramme a été réalisée selon les recommandations de la Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (**CASFM**) (**2012**).

VI.2.9. Utilisation des différents substrats carbonés /Production de H_2S :

Ce test est réalisé en utilisant le milieu TSI (gélose au Glucose, Lactose, Saccharose et H_2S). Des tubes contenant le milieu TSI sont ensemencés puis incubés pendant 7 à 14 jours à $30\pm 1^\circ\text{C}$ (**Marchal et al., 1991**). Les résultats se manifestent comme suit :

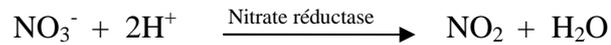
- Lactose-saccharose positif: pente virant au jaune.
- Glucose positif: culot jaune.
- H_2S positif: noircissement du milieu dans la zone joignant la pente.

VI.2.10. Utilisation du citrate comme seule source de carbone

La pente du milieu de citrate de Simmons est ensemencée selon une strie longitudinale au moyen d'une pipette Pasteur stérile avec un inoculum de la souche. L'incubation s'effectue à $30\pm 1^\circ\text{C}$. L'observation de la croissance se fait quotidiennement durant une semaine (**Marchal et al., 1991**).

VI.2.11. Réduction des nitrates

Des tubes contenant 10 ml du milieu bouillon nutritif supplémentés par 0,1 % (P/V) de nitrates de potassium sont ensemencés, puis incubés à 30±1°C. Au 5^{ème}, 10^{ème} et 14^{ème} jour, 3 gouttes des réactifs I et II sont ajoutées à 1 ml de la culture. La réduction des nitrates en nitrites est mise en évidence par l'apparition d'une coloration rouge.



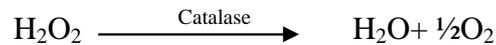
En l'absence de cette coloration, quelques milligrammes de poudre de zinc sont alors ajoutés:

- L'apparition de la coloration rouge indique un test négatif (les nitrates du milieu ne sont pas réduits par la souche).

- En l'absence de la coloration, le test est considéré comme positif (les nitrates sont réduits au-delà du stade des nitrites) (**Marchal et al., 1991**).

VI.2.12. Recherche de catalase

Cette enzyme permet la dégradation du H₂O₂ qui résulte de l'oxydation par l'oxygène de l'air:



Cette réaction est mise en évidence simplement par contact de la culture avec une solution fraîche de H₂O₂ à 10 volumes : une goutte d'eau oxygénée est placée sur une lame en présence d'un échantillon de culture. Un dégagement gazeux abondant sous forme de mousse ou de bulle traduit la décomposition de dioxygène: le test catalase est positif et s'il n'y a pas de bulles: le test catalase est négatif (**Delarras, 2007**).

VI.2.13. Recherche de l'Uréase

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes d'Urée-indole sont ensemencées. La lecture effectuée après 48 h d'incubation à 30±1°C (**Marchal et al., 1991**).

- Si la couleur de milieu vire vers le rouge: Uréase positive.
- Si la couleur de milieu reste inchangée: Uréase négative.

VI.2.14. Recherche de la production d'indole

4,5 ml d'eau physiologique contenant 4 gouttes d'Urée-indole sont ensemencées. La lecture effectuée après incubation à 30±1°C pendant 48 h. 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs sont ajoutées à 1 ml de la culture. Une réaction positive se traduit par l'apparition d'un anneau rouge vermillon à la surface (**Marchal et al., 1991**).

- **Remarque :**

La coloration de Gram, les tests de sensibilité aux antibiotiques et la recherche de catalase sont effectués pour les souches d'actinomycétales ainsi que pour les bactéries pathogènes.

VI.3. Caractérisation génétique des souches d'actinomycètes

VI.3.1. Extraction d'ADN génomique des actinomycètes

Trois techniques de biologie moléculaire pour l'extraction de l'ADN génomique bactérien ont été utilisées et testées selon les protocoles de **Miniprep of genomic DNA**, de **Kumar *et al.* (2010)** et de **Pernodet (2010)**.

Les souches d'actinomycétales sont mises en culture dans 50 mL de bouillon Bennett durant 4 jours à 28 ± 1 °C et sous agitation. Une centrifugation de 10 min à 13000 rpm et à une température de 4°C permet de culotter les bactéries.

VI.3.1.1. Protocole de Miniprep of genomic DNA

L'ADN des souches d'actinomycétales a été isolé à partir de 50 ml de culture avec un kit d'extraction Miniprep selon le protocole indiqué par le fabricant. Les souches bactériennes sont cultivées dans le bouillon Bennett à 28 ± 1 °C pendant 4 jours.

50 µl du culot de culture cellulaire des actinomycètes sont remis en suspension dans 500 µL de solution SET (75 mM NaCl, 25 mM EDTA pH 8, 20 mM Tris-HCl pH 7,5). 10 µL de lysozyme (50 mg/mL) sont ajoutés. Le mélange est incubé 30 min à 37 ± 1 °C sous agitation (800 rpm).

Après l'ajout de 14 µL de proteinase K (20 mg/mL) et agitation, 60 µL de SDS 10% (p/v) sont additionnés et le mélange est laissé 1h à 55 ± 1 °C (ou jusqu'à l'homogénéisation totale).

Après l'ajout de 200 µL de NaCl 5 M, et 500 µl de chloroforme et agitation respective après chaque addition, une centrifugation de 10 min à 12.000 rpm permet d'éliminer les débris précipités. La phase aqueuse supérieure est récupérée et 480 µL (0.6 du volume du surnagent) d'isopropanol sont ajoutés; le mélange est centrifugé 5 min à 12000 rpm et le culot est lavé avec l'éthanol 70%, puis séché. L'ADN est ensuite repris dans 100 µL de TE (10 mM Tris/HCl, 25 mM EDTA pH 8).

VI.3.1.2. Extraction d'ADN génomique par le protocole de Kumar et al. (2010)

Chaque souche est incubée à $30\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 2 jours et sous agitation modérée (180 rpm). Les tubes de milieu Bennett (30 ml) sont ensuite centrifugés à 10000 rpm pendant 10 min dans une centrifugeuse thermorégulée à $4\pm 1^\circ\text{C}$. Le surnageant de culture est soigneusement éliminé et 0,1g de la culture cellulaire est transféré stérilement dans un mortier, puis broyé avec de l'azote liquide. Le mycélium broyé est resuspendu dans 500 μL de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 25 mM d'EDTA) auquel du lysozyme a été ajouté (20 mg/mL final).

Le mélange est incubé pendant 30 min à $37\pm 1^\circ\text{C}$. 20 μL de protéinase K à 20 mg/mL et 20 μL de SDS à 10% sont ajoutés et le mélange obtenu est incubé à $55\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 30 min. Le lysat clair et visqueux obtenu est refroidi, puis il subit une extraction au phénol/chloroforme (v/v, 1/1). Après centrifugation à 10000rpm pendant 5 min, la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN est recueillie puis additionnée d'éthanol à $-20\pm 1^\circ\text{C}$, le mélange est placé 30 min à $-20\pm 1^\circ\text{C}$. Après centrifugation, le culot est lavé deux fois à l'éthanol 90% (v/v). L'ADN obtenu est dissous dans le tampon TE contenant 20 μL de RNase à 20 $\mu\text{g/mL}$ puis incubé à $37\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 1h. L'opération d'extraction d'ADN avec phénol/chloroforme est renouvelée une deuxième fois et la précipitation est réalisée comme ci-dessus.

VI.3.1.3. Extraction de l'ADN génomique par le protocole de Pernodet (2010)

Les souches bactériennes sont cultivées dans 50 ml de milieu Bennett à $28\pm 1^\circ\text{C}$ pendant 4 jours. La culture est alors centrifugée à 47000 rpm pendant 20 min et à $4\pm 1^\circ\text{C}$, puis le surnageant est soigneusement éliminé. Ensuite les mycéliums sont broyés dans l'azote liquide dans un mortier refroidi à $-70\pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à l'obtention d'une poudre fine. Cette dernière est transférée dans un tube et centrifugée (10000 rpm, 10 min, $4\pm 1^\circ\text{C}$). Le culot est repris dans 10 ml du tampon TE et 500 μL de SDS 20%, puis la solution est mélangée par vortex. Après une incubation de 30 min à $65\pm 1^\circ\text{C}$, 3 ml d'acétate de potassium (3M, pH 5, NaOH 3M pH 5.0) sont ajoutés et le mélange est laissé 30 min à 1 h dans la glace.

Après centrifugation à 10000 rpm/10 min/ $4\pm 1^\circ\text{C}$, le surnageant est récupéré et 2 volumes d'éthanol sont ajoutés et homogénéisés par retournements successifs. Le mélange est placé une nuit à $-20\pm 1^\circ\text{C}$ d'où l'apparition des filaments d'ADN, puis il est centrifugé (47000 rpm, 20 min, $4\pm 1^\circ\text{C}$). Le culot est ensuite repris dans un petit volume de TE-RNase A (100 $\mu\text{g/mL}$) puis transféré dans un tube eppendorf de 2 ml. Le surnageant total contenant l'ADN est traité par l'ajouté d'un $\frac{1}{2}$ volume de phénol/chloroforme puis agité et centrifugé. Après on réalise

un renouvellement de l'opération une deuxième fois, et si un précipité apparaît à l'interface (les protéines et les débris cellulaires forment un précipité blanc à l'interface), recommencer l'opération une troisième fois jusqu'à bien observer l'interface entre les 2 phases. La phase aqueuse supérieure récupérée est ajoutée à 2 volumes d'éthanol et à $1/10^{\text{ème}}$ du volume d' $(\text{NH}_4)\text{OAc}$ 7.5 M. Après homogénéisation, une incubation d'une heure à $4\pm 1^\circ\text{C}$ a été faite, suivie par une centrifugation de 10 min à vitesse élevée. Le culot obtenu est repris par le tampon TE-RNase.

Une estimation de la concentration et de la qualité des ADN extraits est réalisée en faisant migrer 2 μL d'échantillon sur un gel d'agarose à 0,8% préparé en tampon TAE 1X (tampon TAE : 40 mM Tris, 0,001 % acide acétique et 0,001 M EDTA, pH 8). Les ADN sont stockés à $4\pm 1^\circ\text{C}$.

VI.3.2. Amplification des gènes par PCR

Le principe de la PCR consiste à amplifier de manière exponentielle un fragment d'ADN en utilisant une ADN polymérase.

L'enzyme et son tampon sont choisis selon les besoins de la PCR. Pour une amplification de la matrice, on utilisera la *Pfu* polymérase (Promega) ou la *Taq* polymérase (Sigma). Les PCR sont réalisées avec un thermocycleur Mastercycler Personal (Eppendorf). Les amorces oligonucléotidiques utilisées ont été obtenues de Eurofins MWG Operon (Paris, France) (Tableau 15).

Le milieu réactionnel d'un volume final de $25\mu\text{L}$ comprend 1 μL d'ADN génomique sert de matrice à une PCR (10 μM de chaque dNTP; tampon PCR 10X, 5 μL ; amorce 1 (sens), 10 μM , 0.5 μL ; amorce 2 (anti sens), 10 μM , 0.5 μL ; *Pfu* ou *Taq* Polymerase 0.2 μL ; DMSO 100%, 2.5 μL ; H_2O mQ qsp 25 μL).

Les conditions de PCR peuvent varier mais la condition générale est la suivante :

Les tubes sont placés dans un thermocycleur automatique (Eppendorf) qui réalise ensuite les variations de température suivantes: une dénaturation de 3 min à 95°C , 30 cycles d'amplification comportant chacun une dénaturation de 20 sec à 94°C , une étape d'hybridation des amorces de 20 sec à 58°C et une élongation de 30 sec à 72°C . La PCR se termine par une étape finale d'extension à 72°C pendant 10 min.

Les produits de PCR résultants ont été analysés par électrophorèse sur un gel d'agarose 1%. Le tampon utilisé pour la migration et la préparation du gel est du TAE 1X : Tris-Acétate, EDTA (acide Diamine Ethylène-Tétra-Acétique). Les sels contenus dans ce tampon permettent la conduction du champ électrique dans la cuve d'électrophorèse horizontale. Nous

utilisons un gel à 0,8 à 1% d'agarose. L'agarose en poudre est porté à ébullition au four à micro-onde dans du tampon TAE 1 X, puis, 2 µL de BET sont ajoutés. Les échantillons sont alourdis par un tampon de charge gel-red (Blue/Orange Loading Dye, 6X (Promega) (1 µL/ 1 ml du gel) et sont déposés dans les puits du gel d'agarose immergé dans du tampon TAE 1X. Le marqueur de taille:1Kb DNA Ladder (Promega) sert de référence pour estimer la taille des fragments d'acides nucléiques (El Khoury, 2007). Avant le séquençage (Genome Express, France), les fragments d'ADN amplifiés par PCR ont été purifiés à partir des gels d'agarose à l'aide d'un kit de purification Gene Clean® Turbo for PCR.

Tableau 15 : Liste des amorces utilisées pour les amplifications d'ADN par PCR au cours de l'étude – Séquence et température d'hybridation.

Amorces	Séquence (5'->3')	Quantité [µg]	Quantité [n mol]	Tm [°C]	% GC
Amorces spécifiques d'actinomycètes (Farris et Olson, 2007; Schäfer <i>et al.</i>, 2010)					
Com2xf	AAACTCAAAGGAATTGACGG (20)	360	58.3	53,2	40%
Ac1186r	CTTCCTCCGAGTTGACCC (18)	382	71.0	58,2	61,1%
ACT235f	CGCGGCCTATCAGCTTGTTG (20)	406	66.6	61,4	60%
ACT878r	CCGTACTCCCCAGGCGGGG (19)	373	64.4	67,5	78,9%
Amorces universelles					
Eubac27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG(20)			57,3	
Eubac1492R	GGTTACCTTGTTACGACT(18)			52,4	

VI.3.2.1. Outils d'interprétation du séquençage

- **Artemis** est un logiciel d'exploration du génome. En lisant le génome d'un actinomycète à partir de ce logiciel, il est possible de retrouver le gène 16 S. Nous choisissons de trouver la séquence du gène 16S de *Strepto-coelicolor*, car le génome de cet actinomycète a peu évolué par rapport aux autres. La séquence du gène 16S est donc restée pseudo-primitive. Elle nous est utile pour la comparer à celle des actinomycètes d'étude afin de reconstituer leur séquence du gène 16 S.

- Les séquences ne sont pas tous lues dans le même sens car certaines ont été codées par des transcriptases inverses. On retrouve donc leurs séquences complètement renversées. Le logiciel **JaMBW** permet d'inverser les séquences pour les mettre dans le même sens de lecture que les autres.

- **ClustalW2** permet ensuite de comparer les différentes séquences du même gène obtenue avec différentes amorces pour essayer de reconstituer la plus grosse partie du gène possible. On doit aussi s'appuyer sur la séquence du gène 16 S de *Strepto-coelicolor* pour savoir où le gène commence et termine.

- Lorsque les séquences des gènes 16 S d'actinomycètes sont reconstituées, il est possible, à l'aide du logiciel **Blast**, de les comparer à une base de données comportant une quantité importante de génomes. Le logiciel calcule le pourcentage de similitude du gène à tous les gènes 16 S les plus ressemblants et donne estimation de l'espèce. Le logiciel Blast contient de nombreux génomes de procaryote et eucaryote.

VI.3.3. Amplification des gènes de systèmes génétiques des Peptides lasso

Des fragments d'environ 500 bp sont préparés par PCR avec les amorces présentées dans le tableau 16. Les réactions PCR sont réalisées dans un volume final de 25µl contenant 1 µL d'ADN génomique des bactéries ; 10 µM de chaque dNTP, 1 µL ; 10 mM de chaque amorce, 2,5 µL ; du tampon *Taq* Reaction ; Enzyme *Taq* DNA 5000 U/mL, 0,5 µl ; DMSO 100%, 2,5 µL; H₂O mQ qsp 25µL.

Pour l'amplification des gènes recherchés, les trois étapes d'un cycle de PCR se déroulent à des températures précises dans un thermocycleur Mastercycler Personal (Eppendorf) selon le programme suivant : une étape de dénaturation initiale à 95°C pendant 3min, suivie par 10 premiers cycles de 20s à 95°C, 20s à 42°C/48°C et 25s à 68°C, puis 20 cycles de 20s à 95°C, 20s à 48°C/54°C et 25s à 68°C. Les éventuelles amplifications résiduelles ont été terminées à 72°C pendant 10 min. Les produits de PCR peuvent ensuite être gardés à 4°C pendant la journée ou stockés à -20°C, afin d'être séparés par électrophorèse

(100 voltes) sur gel d'agarose 2% (P/V) dans le tampon de TAE 1 X ajouté de gel-red. Les bandes attendues sont découpées et purifiées avec le kit Gene Clean® Turbo for PCR. 20 µL du produit de PCR ont été séquencés par Genome Express et MWG Biotech (France) après un dosage par nanodrop.

Tableau 16 : Caractéristiques des amorces oligonucléotidiques utilisées pour la recherche de gène codant un peptide lasso (Rournissuer, MWG).

Nom	Séquence (5'- 3')	Sens (Forward ou Reverse)	Tm [°C]
SvC-Af	ACCTGTCCGGCGGCACGTTCCGGACATCGCGAGC	F	72,8
SvC-Br	GCCGCCGTGGCCCGCGTAGTCGAACGTGTG	R	70,5
SvB-Cr	GCCGTCGGCCTCGACTCCAACGTGCAGT	R	70,5

VI.3.4. Outils statistiques et bioinformatiques

Les amorces utilisées pour la recherche d'amorces de screening de systèmes génétiques LASSO ont été créées en utilisant les sites Web et logiciels suivants :

- GenBank, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/> (numéro d'accèsion AAD28495.1) : séquences de genre mcjB d'*Escherichia coli*.

- Les amorces ainsi créées sont ensuite confrontées aux bases de données afin de vérifier leur spécificité en utilisant le programme BLAST2, (Basic Local Alignment Search Tool) à l'adresse suivante : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>. Cet algorithme permet de déterminer la similitude entre une séquence nucléotidique donnée et les séquences présentes dans les banques de données (NCBI) (**Lacroix, 2008**).

- Clustal, <http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/index.html>, pour l'alignement multiple.
- BLOCKMAKER, http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/blockmkr/www/make_blocks.html, pour la mise en forme de blocs : input CODEHOP.

- CODEHOP, <http://bioinformatics.weizmann.ac.il/blocks/codehop.html>, pour le design d'amorces dégénérées.

Chapitre II : Les bactéries lactiques

Chapitre II.

Les Bactéries lactiques

I. Origine des échantillons

Huit échantillons de préparations laitières traditionnelles ont été prélevés à partir de quatre régions du Sahara Algérien durant la période de juin-décembre 2008 (Tableau 17 et Figure 17). Ces prélèvements ont été transportés à froid au laboratoire pour être analysés (Tableau 8, Figure 18).

Tableau 17: Situation géographique des stations d'échantillonnage.

Région	Altitude (mètres)	Latitude (Nord)	Longitude (Ouest)	Étage bioclimatique
Adrar	300-400	28° 50'	0° 10'	Aride chaud
Laghouat	824	33° 34'	2° 40' Est	Aride à Saharien
El Bayadh	765	32° 30'	1° 10' Est	Arid froid
Méchia (Naâma)	1149	33° 31'	0° 17'	Arid

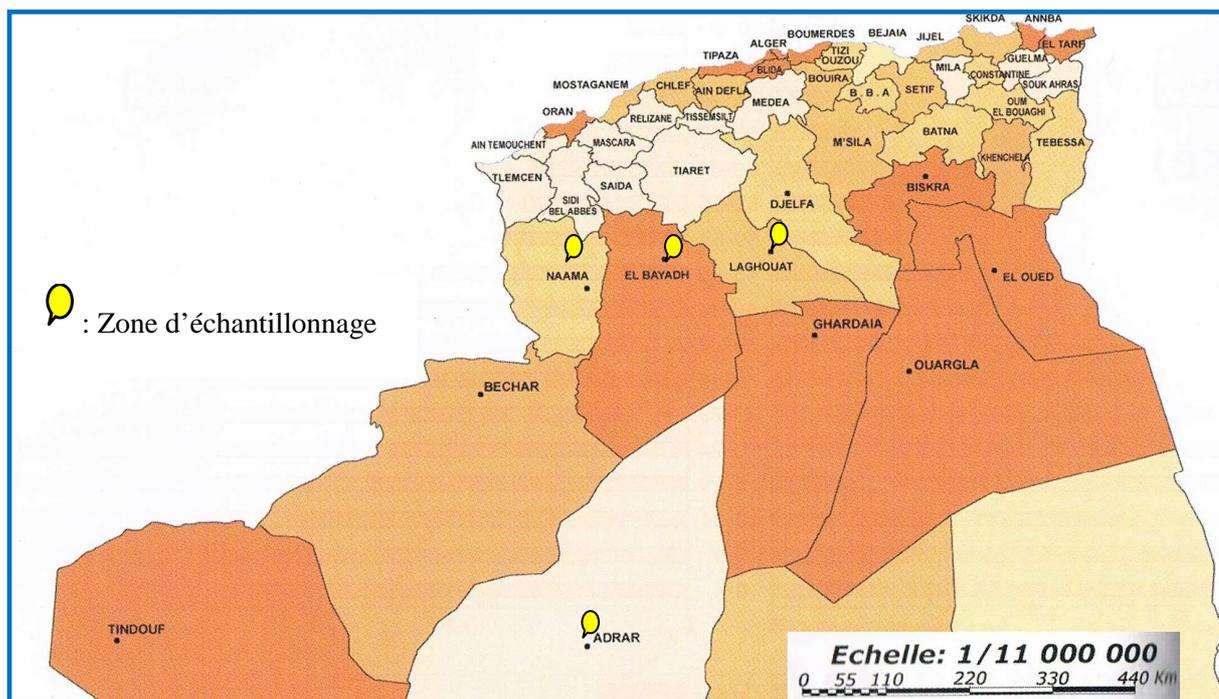


Figure 17: Les régions d'échantillonnage des produits laitiers traditionnels (Djazairouna l'Atlas pratique de l'Algérie, 2004).

Tableau 18 : Caractéristiques des échantillons prélevés.

Numéro d'échantillon	Application traditionnelle	Origine	Date de prélèvement	Matière de production	Observation
E ₁	Beurre traditionnel (<i>Zabda</i>)	Wilaya d'Adrar	Juin 2008	Lait de brebis	Matière très molle
E ₂	Beurre liquide traditionnel (<i>Dhan</i>)	Wilaya de Laghouat	Septembre 2008	Lait de vache	Matière fondu
E ₃	Beurre liquide Traditionnel (<i>Dhan</i>)			Lait de brebis	Matière fondu
E ₄	Klila	Wilaya de Laghouat	Novembre 2008	Petit lait de brebis	Patte très dure coupée en morceaux
E ₅	Klila	Wilaya d'El Bayadh			
E ₆	Klila cru	Wilaya de Méchéria	Décembre 2008	Lait de vache	Patte molle
E ₇	Jben				Matière très molle
E ₈	Beurre traditionnel (<i>Zabda</i>)				



Figure 18: Photos des échantillons des préparations lactières traditionnelles. *A.* Zabda d'Adrar, *B.* Jben de Mecheria, *C.* Dhan de Laghouat, *D.* Klila cru de Mecheria et *E.* Klila d'El Bayadh.

II. Préparation des produits laitiers traditionnels

Les laits de vaches et de brebis sont consommés par les nomades soit à l'état naturel ou bien après leurs transformations en produits dérivés tels que le beurre (*Zebda* ou *Dhan*), le fromage frais (*Jben*) ou la *Klila*. Leurs préparations traditionnelles s'effectuent selon les diagrammes 1 et 2 illustrés dans l'annexe 1.

Des essais de fabrication expérimentale du fromage à pâte molle (*Jben*) (Figure 42, annexe 1) ont été réalisés en utilisant de cocci lactiques mésophiles isolés de différents types du lait selon un schéma de type industriel combinant l'emploi du lait pasteurisé, l'ajout de présure animale et de levains acidifiants (**Bendimerad, 2013**).

III. Mesure du pH

Le pH des échantillons a été déterminé directement en utilisant un pH-mètre (HANNA Inst. pH 211, microprocessor pH meter) où l'électrode a été insérée directement dans chaque échantillon (**Owusu-Kwarteng, 2012**).

IV. Analyses microbiologiques

IV.1. Dénombrement des micro-organismes revivifiables

Cinq grammes de chaque échantillon ont été prélevés de façon stérile et dilués dans 45 ml d'eau physiologique (0,9% de NaCl, P/V). La suspension ainsi obtenue constitue la dilution 10^{-1} qui a servi pour la réalisation d'une gamme de dilutions sérielles (de 10^{-2} jusqu'au 10^{-7}).

Les ensemencements sont réalisés sur la gélose P.C.A (Plate Count Agar) pour le dénombrement en étalant en surface 0,1 ml des dilutions décimales obtenues. Les boîtes de Pétri sont incubées à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 48 à 72 h.

On calcule le nombre des colonies et on exprime les résultats sous forme du nombre de micro-organismes revivifiables à $30 \pm 1^\circ\text{C}$ par millilitre en tenant compte du facteur de dilution éventuel.

On dénombre les boîtes de Pétri présentant entre 30 et 300 colonies.

IV.2. Isolement des bactéries lactiques

Dix grammes de chaque échantillon (*Jben*, *Klila*, *Dhan* ou *Zebda*) ont été homogénéisés avec 90 ml de l'eau physiologique stérile (0,85% de NaCl, P/V, Merck, Germany) additionnée de peptone (0,1%, P/V, Merck, Germany). Ensuite, des dilutions décimales (de 10^{-1} à 10^{-7}) ont été préparées, et pour chaque dilution un volume de 0,1 ml a été étalé en surface sur les milieux d'isolement.

L'isolement des bactéries lactiques est réalisé sur les milieux MRS (Man–Rogosa–Sharpe, Fluka Biochemika, 69964) et M17 (Fluka Biochemika, 63016). Les cultures sont incubées pendant 72 h à $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ et $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ dans des boîtes de Pétri à l'obscurité. En basant sur les aspects morphologiques (taille, couleur, surface, profondeur...), les colonies sont repiquées sur le milieu MRS et incubées à $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ ou $45\pm 1^{\circ}\text{C}$ afin de s'assurer de la pureté des cultures qui sont par la suite conservées dans des tubes à essais contenant le milieu MRS incliné à $4\pm 1^{\circ}\text{C}$ à l'obscurité (**Kacem et Karam, 2006 ; Cheriguene et al., 2007**). Ces colonies serrent comme une échantillothèque.

V. Conservation des souches

La conservation des souches isolées pures a été réalisée soit sur la gélose MRS inclinée à $4\pm 1^{\circ}\text{C}$; soit sur le milieu MRS contenant du glycérol 20% à -20°C .

VI. Identification des bactéries lactiques

Sur chacune des boîtes servant aux dénombrements, nous classons les colonies en catégories selon leur aspect macroscopique. Dans chaque catégorie, nous choisissons aléatoirement une colonie supposée représentative parmi celles, observées pour réaliser les premiers tests d'orientation.

Pour une identification préliminaire des bactéries lactiques, nous nous sommes basés sur des études :

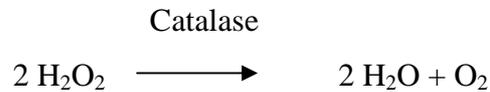
- microscopiques (les formes caractéristiques des cellules microbiennes, leur arrangement, la présence ou non de spore et leur coloration de Gram),
- de la mobilité, du test de catalase et du type fermentaire (**Ho, 2008**).

VI.1. Coloration de Gram

La coloration de Gram a été effectuée selon le protocole décrit par **Delarras (2007)** (voir annexe 2).

VI.2. Test de la catalase

Chez les bactéries douées d'un métabolisme oxydatif, le système respiratoire compte parmi d'autres enzymes une catalase, celle-ci décompose l'eau oxygénée selon la réaction suivante :



La méthode de recherche de la catalase consiste à étaler une colonie sur une lame de verre sur laquelle on ajoute une goutte de H₂O₂ à 10 volumes. La présence de l'enzyme se manifeste par un dégagement de bulles de gaz (Zinedine, 2004).

VI.3. Etat frais

Un tube contenant le milieu MRS liquide (10ml) est inoculé par une colonie. On incube à 28±1°C pendant 16 à 24h, jusqu' à l'apparition d'un trouble microbien. Pour vérifier la mobilité et la forme, une lame additionnée d'une goutte de la culture est observée au microscope.

VI.4. Identification biochimique

Les bactéries Gram positif et catalase négative ont fait l'objet d'une analyse biochimique par le système API bioMérieux en utilisant la galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMerieux, Marcy l'étoile, France).

L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant (voir annexe 3).

VI.5. Techniques de biologie moléculaire

VI.5.1. Extraction d'ADN des bactéries lactiques

L'extraction est effectuée avec le kit «PureLink™ Genomic DNA Kits® Invitrogen» selon le protocole indiqué par le fabricant.

Les cultures de bactéries lactiques sont réalisées en 10 ml de bouillon de MRS pendant 24h à 30±1°C sans agitation.

Le bouillon est ensuite centrifugé à 8000 g pendant 10 min et à une température de 4°C. Le surnageant est ensuite éliminé délicatement. Le culot obtenu est resuspendu dans un tampon lysozyme digestion composé de Tris-HCl, 25 mM, pH 8.0 ; EDTA, 2.5 mM, 1% Triton X-100, de lysozyme (Sigma) 20 mg / mL. Le volume final tampon/échantillon est d'environ 200 µL.

La lyse cellulaire a été faite par incubation durant 30 min à 37±1°C, sous agitation d'où l'obtention des protoplastes.

La digestion des protéines est réalisée par traitement à la Protéinase K (20 µL : 20 mg/ml), suivi par une agitation au vortex. 200 µL du tampon de lyse (PureLink™ Genomic Lysis/Binding Buffer) sont ajoutés, après une bref agitation au vortex, le mélange obtenu est incubé à 55±1°C pendant 30 min.

Après l'addition de 200 µl d'éthanol (96-100%) et homogénéisation au vortex pendant 5 secondes, une solution homogène est obtenue.

L'ADN est ensuite lavé et élué à l'aide du kit selon le protocole indiqué par le fabricant. Le stockage de l'ADN purifié se fait à 4°C pour une utilisation immédiate et à -20°C pour une conservation à long terme.

Une migration de l'ADN par électrophorèse permet de contrôler la qualité de l'ADN extrait, de visualiser une éventuelle dégradation, et d'en estimer la quantité. On réalise un gel d'agarose 0,8% dans du TAE 1X contenant 0,8 µg/ml de bromure d'éthidium (BET). La migration s'effectue pendant 30 min à 90V : l'ADN chargé négativement migre vers l'anode. Un marqueur, mélange de fragments d'ADN de tailles connues, migre parallèlement à l'ADN étudié et sert de référence de taille. Le BET s'intercale entre les bases de la molécule d'ADN et permet de visualiser les ADN dans le gel sous UV (**Postec, 2005**).

VI.5.2. Quantification des acides nucléiques

La concentration et la pureté de l'ADN ont été déterminées par spectroscopie UV à 260 et 280 nm sur un spectrophotomètre UVKJON 932. Le rapport de l'absorbance à 260 nm sur celle à 280 nm permet d'estimer la pureté de l'ADN. Lorsque la valeur est inférieure à 1,65 ou supérieure à 2, les solutions sont considérées comme contaminées respectivement par des protéines ou de l'ARN (**Duquesne, 2007**). Le protocole du dosage UV des acides nucléiques est décrit dans l'annexe 4.

VI.5.3. Amplification in vitro de fragments d'ADN

La PCR est une technique d'amplification spécifique d'une séquence d'ADN grâce à l'emploi de deux oligonucléotides de synthèse qui s'hybrident avec des séquences qui leurs sont complémentaires et qui bordent la séquence à amplifier (Smaoui, 2010).

Dans notre étude, cette méthode est utilisée pour amplifier le gène ADN 16S de bactéries lactiques.

Les fragments d'ADN ont été générés à l'aide de l'ADN *Taq* polymérase (Promega), le milieu d'amplification contient :

- Tampon 10X (Qbiogen)*	5µL (1 X final)
- dNTPs (Eurogentec, 20 mM total)	1µL (12,5 µM final pour chaque)
- Amorce sens	1 µL (10 µmol)
- Amorce anti-sens	1 µL (10 µmol)
- <i>Taq</i> polymérase (Qbiogen, 5U/µL)	0,25 µL
- Matrice ADN	10 µL (2 ng/ µL)
- Eau MilliQ stérile	QSP 50µL

*Le tampon (Qbiogen) contient 10 mM de Tris-HCl pH9, 50 mM de KCl, 1,5 mM de MgCl₂, 0,1% de Triton X 100 et 0,2 mg/ml de BSA (Bovin Serum Albumin).

Le programme de PCR usuel, réalisé à l'aide d'un thermocycleur (model Mastercycler personal), était le suivant :

- dénaturation totale de 5 min à 94°C ;
- 32 cycles de dénaturation (30 s à 94°C) / hybridation (30 s à 55°C) / élongation (1 min par kb à 72°C) ;
- élongation terminale de 5 min à 72°C.

Les deux oligonucléotides utilisés sont :

Direct Oliogo 1385 R: CGG TGT GTR CAA GGC CC (Tm 57°C)

Réverse oligo 27 F: GAG TTT GAT CCT GGC TCAG (Tm 58°C) (Rheims, 1996).

VI.5.4. Electrophorèse des fragments d'ADN

La séparation des fragments d'ADN suivant leur taille est obtenue par électrophorèse en gel d'agarose dans du tampon TAE 1X (tampon TAE : 40 mM Tris, 0,001 % acide acétique et 0,001 M EDTA, pH 8, coloration au BET). La concentration d'agarose dans le gel est de 0,7% (p/v). Le marqueur de taille utilisé est le marqueur 1kb (New England Biolabs). Les fragments d'ADN sont visualisés aux ultraviolets ($\lambda=254$ nm) après une incubation de 15 min dans une solution de bromure d'éthidium (1 µg/mL).

VII. Antagonisme

VII.1. Préparation des précultures des bactéries tests (pathogènes)

Avant l'utilisation des souches de bactéries pathogènes (Tableau 19), ces bactéries sont cultivées à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ sur 10 mL de bouillon nutritif (*Listeria monocytogenes* sur le bouillon TSB), pendant 18 à 24h. La culture d'une nuit obtenue servirait d'inoculum.

VII.2. Antagonisme Bactéries lactiques / Bactéries pathogènes

L'étude de l'antagonisme à été faite en utilisant la méthode décrite par **Fleming et al. (1975)**. Une boîte contenant le milieu MRS à 1,2 % d'agar et 0,2 % de glucose estensemencée par touche d'une culture de bactéries lactiques, l'incubation se fait à $28 \pm 1^\circ\text{C}$ jusqu'à l'obtention de colonies confluentes (environ 48h).

Ensuite, on inocule un tube contenant 10 mL de milieu MRS semi-solide (0,7% d'agar et 0,2% de glucose), avec 0,5 ml de la préculture. Après incubation à $37 \pm 1^\circ\text{C}$ pendant 24h, l'activité antibactérienne est déterminée par la mesure des diamètres des zones d'inhibition.

Tableau 19: Origines des souches utilisées dans les différents tests d'antagonisme.

Bactérie	Gram	Code	Origine
<i>Staphylococcus aureus</i>	Positif	ATCC 6538	MNHN
<i>Micrococcus luteus</i>		ATCC 9341	MNHN
<i>Listeria monocytogenes</i>		ATCC 19111	LAPRONA
<i>Bacillus cereus</i>		ATCC 25921	LAPRONA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	négatif	ATCC 27853	MNHN
<i>Escherichia coli</i>		ATCC 8739	MNHN

MNHN : Muséum National d'Histoire Naturelle (Paris) ; **LAPRONA** : Laboratoire des Produits Naturels (Université de Tlemcen).

VII.3. Production et purification des bactériocines

Les souches de bactéries lactiques ont été cultivées dans 10 mL de milieu MRS à 30±1°C sans agitation jusqu'à la phase stationnaire de croissance pendant environ 72h. Après, le culot cellulaire a été séparé du surnageant de culture bactérienne par centrifugation à 8000 g pendant 10 min à 4 °C. Ce dernier est filtré à travers un pore de diamètre 0,22 µm puis les protéines ont finalement été concentrées par ultrafiltration (3000g, 20min, 4°C) sur Centriprep 30 kDa (Millipore).

Pour l'évaluation de l'activité antibactérienne, 10 µL du concentrat à tester ont été déposés directement sur la gélose molle préalablement mélangée à la bactérie cible. Des contrôles positifs ont été réalisés en déposant 5 µL d'ampicilline (50 µg/mL) sur le mélange gélose molle/ bactérie cible.

L'ensemble a ensuite été cultivé pendant la nuit. Les diamètres des zones d'inhibition de la croissance ont été mesurés après 16 h de culture (**Duquesne, 2007; Makhloufi, 2011**).

Résultats & Discussion

Chapitre I : Les actinomycètes

Chapitre I.

Les actinomycètes

I. Caractéristiques physicochimiques des échantillons

Les caractéristiques physicochimiques des échantillons prélevés sont résumées dans le tableau 20. On constate que l'ensemble des échantillons examinés (sols forestiers, montagneux, etc...) représente des écosystèmes riches en débris végétaux et matières organiques, ils se caractérisent par des pH neutres ou légèrement alcalin allant de 7,41 à 8,88.

Les échantillons de la région saharienne oued et oasis dont les pH respectifs sont 8,88 et 7,49-8,66 sont des sols qui tendent vers l'alcalinité.

Tableau 20 : Paramètres physicochimiques des échantillons de sol.

Paramètre		pH	Taux d'humidité	CaCO ₃ Total (%)	Conductivité (µS.Cm ⁻¹)	Texture ^a
Région/Échantillon						
Tlemcen	Cinq forets	7,41-8,16	1,583-2,502	1,85-6,48	232-441	A- SA
	Cinq Montagnes	7,60-8,27	0,382-0,928	5,55-30,12	220-1361	A- AS
	Oued	8,11	1,0205	8,385	335	AS - SA
	Barrage	8,09	0,542	12,17	205	SA
Laghouat	Oued M'Zi	8,88	0,16	6,43	92	S
	Oasis	7,49-8,66	0,08-2,06	12,4-15,79	218-1827	A

µS : micro siemens (unité) ; ^a Texture : S = Sableuse; A = Argileuse; AS = Argile Sableuse; SA = Sable Argileux (Baize, 2000).

Selon **Lee et Hwang (2002)** le taux d'humidité d'un sol est considéré connue : faible si le pourcentage d'humidité est compris entre (2.0 et 9.0) : modéré dans le cas où le pourcentage d'humidité varie de 9.1 à 13.0 et élevé si les valeurs sont comprises entre 13.1 et 20.0. Les résultats présentés dans le tableau ci-dessus nous permettent de conclure que tous les échantillons sont des sols caractérisés par des taux d'humidité faibles.

Tableau 21 : Type de sol en fonction de la salure et de la conductivité électrique (**Richards, 1969**).

	Types de sol				
	Non salé	Peu salé	Salé	Très salé	Extrêmement salé
C. ex 1/5 (mS/cm)	<0.6	0.6-1.2	1.2-2.4	2.4-6	>6
Salure (méq/100 g de sol)	<3	3-6	6-12	12-30	>30

C. ex 1/5 (mS/cm) conductivité de l'extrait aqueux 1/5^{ème} ; mS : milli Siemens

En se basant sur les résultats de la conductivité présentés dans le tableau 20 et d'après l'échelle de salure qui en fonction de la conductivité électrique de l'extrait aqueux 1/5^{ème}, présentés dans le tableau 21, nous avons pu classer quelque échantillons des montagnes de Tlemcen et des oasis de Laghouat comme des sols salés, et que les sols des autres échantillons sont des sols non salés.

II. Isolement des actinomyètes

Les actinomycètes sont des bactéries filamenteuses à Gram-positif. Elles constituent l'un des groupes bactériens les plus versatiles et les plus importants de point de vue écologique et biotechnologique. En effet, ces microorganismes ont une grande capacité à produire de nombreux métabolites secondaires ayant des structures chimiques et des activités biologiques très diverses tels que des antibiotiques, des antifongiques, des enzymes, des stimulateurs et/ou des inhibiteurs de la croissance etc... De fait de ces aptitudes, les actinomycètes peuvent représenter un moyen de lutte efficace, persistant et sans effets négatifs vis à vis de l'environnement en comparaison avec les traitements chimiques et remplacer ainsi l'utilisation des antibiotiques systémiques (**Loqman, 2009**).

Les colonies d'actinomycètes ont été reconnues par leur aspect morphologique caractéristique. Elles apparaissent sèches, rugueuses, colorées ou non, adhèrent à la gélose et présentent un mycélium végétatif et aérien, certaines montrent seulement un mycélium du substrat (**Boudemagh, 2007**). Toutes les colonies ont été purifiées par repiquage dans le milieu Bennett ou TSA et incubées à 28 °C pendant 7 jours. Les résultats montrent clairement, que les milieux ISP2 et Bennett est le plus favorable pour l'isolement des actinomycètes à partir de tous les écosystèmes arides et semi-aride testés, et ceci quel que soit le type de sol analysé (Tableau 22, 23). A partir du sol semi-aride des oasis et Oued M'Zi de la région de Laghouat, 19 et 24 souches d'actinomycètes ont été isolées, c'est le plus grand nombre d'actinomycètes obtenu dans cette étude (Tableau 22). Seize souches d'actinomycètes ont été également récoltées du sol de la forêt N°1 de Tlemcen, il s'agit aussi du plus grand nombre d'actinomycètes isolés parmi les sols arides de toutes les forêts de la wilaya de Tlemcen (Tableau 22, 23).

À partir des milieux sélectifs utilisés additionnés d'antifongiques (actidione et nystatine), 108 colonies d'actinomycètes ont été prélevées, elles sont repérées d'après leur aspect macroscopique (colonies dures incrustées dans la gélose) (Figure 19) et leur aspect microscopique (aspect filamenteux à coloration de Gram positive).

Le screening ciblé est une stratégie très utilisée dans plusieurs laboratoires, elle permet un isolement sélectif de genres précis. Il est également employé afin d'évaluer la biodiversité d'un échantillon quelconque en en microflore. Il est à signaler, que les zones rhizosphériques sont 10 fois plus peuplées par les actinomycètes, que les zones profondes et non rhizosphérique (de surface) (**Chelli, 2010**). Dans nos investigations, le criblage orienté en employant 8 milieux d'isollements différents a été choisi pour mettre en évidence la présence ou l'absence de genres rares d'actinomycètes dans le sol agricole. Cette stratégie s'accorde parfaitement avec celle de plusieurs chercheurs. D'après (**Cross, 1982**), dans un objectif d'isolement de quelques genres d'actinomycètes, il est conseillé de varier les stratégies et les milieux d'isollements dans le même screening, afin de réussir l'isolement de la plupart de la flore actinomycétale présente dans l'échantillon.

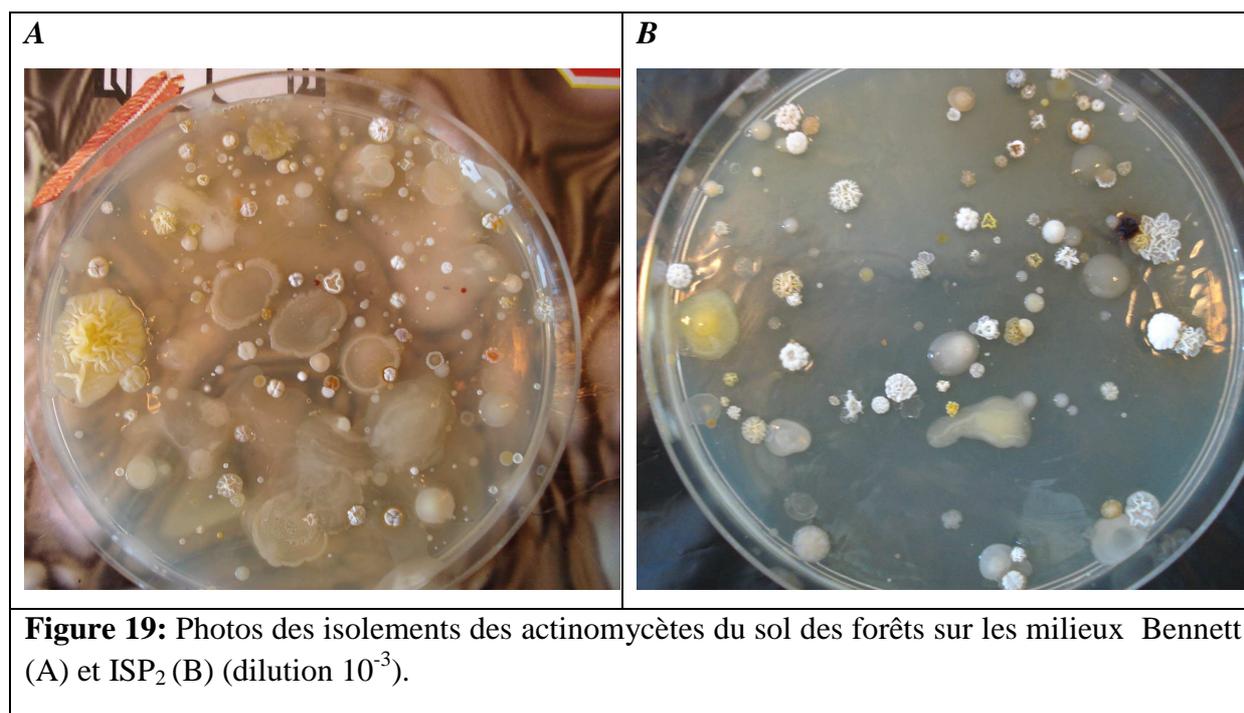


Figure 19: Photos des isollements des actinomycètes du sol des forêts sur les milieux Bennett (A) et ISP₂ (B) (dilution 10⁻³).

Tableau 22: Dénombrement des actinomycètes sur les milieux sélectifs d'isolement (UFC/g).

<i>Milieu</i>	<i>I.S.P₂</i>	<i>Olson</i>	<i>T.S.A</i>	<i>C.V.B</i>	<i>Bennett</i>
<i>E_{1H}</i>	2.10 ³	Ind.10 ³	Ind.10 ³	P.C10 ³	15.10 ³
<i>E₁</i>	5,7.10 ⁴	Ind.10 ³	Ind.10 ¹	P.C 10 ³	7.10 ⁴
<i>E₂</i>	1,1.10 ⁵	5.10 ⁴	10 ⁵	P.C 10 ⁴	6.10 ⁴
<i>E₃</i>	1,3.10 ⁴	5.10 ³	3.10 ³	P.C 10 ⁴	2.10 ⁴
<i>E₄</i>	3.10 ⁵	3.10 ³	2.10 ³	P.C 10 ³	2.10 ⁵
<i>E₅</i>	7.10 ⁵	2,6.10 ⁵	2.10 ⁵	NB.10 ³	3.10 ⁵
<i>E₆</i>	Ind.	Ind.	Ind.	P.C 10 ³	Ind.
<i>E_{7- E₁₁}</i>	2.10 ⁴	Ind.	9.10 ³	P.C 10 ³	Ind.
<i>E_{12- E₁₆}</i>	1,4.10 ⁴	10 ³	4.10 ⁵	P.C 10 ³	9.10 ⁷
<i>E₁₇</i>	10 ³	3,3. 10 ⁴	2,1. 10 ⁴	P.C 10 ³	9.10 ³

Ind. : Indéterminé ; **P.C** : Petites colonies.

Tableau 23: Nombre de souches d'actinomycètes isolées à partir des échantillons du sol.

<i>Code de l'échantillon</i>	<i>Origine</i>	<i>Nombre de souches d'actinomycètes isolées</i>
E _{1H}	Sol de Forêt 01 : Humus	08
E ₁	Sol de Forêt 01	16
E ₂	Sol de Forêt 02	07
E ₃	Sol de Barrage	02
E ₄	Sol de Forêt 03	08
E ₅	Sol de Forêt 04	07
E ₆ (E _{6.1} + E _{6.2})*	Sol d'Oued Lakhdar	05
E ₇ - E ₁₁ (S.B)*	Sol Montagneux Bouhanak	11
E ₁₂ - E ₁₆ (A.E)*	Sol des Oasis-Laghouat El Assafia	24
E ₁₇ (O.M)	Sol de Oued M'Zi-Laghouat	19
Total		108

* Échantillon moyen pour les analyses microbiologiques.

Selon les résultats présentés dans le tableau 23, il apparaît également que le nombre d'actinomycètes isolés de l'échantillon E₁₂- E₁₆ et E₁₇ (régions arides de Laghouat) est nettement supérieur à celui obtenu à partir des autres échantillons. Ceci peut s'expliquer par le fait que ces sols sont riches en matière organique. Ceci est corroboré par la bibliographie des actinomycètes qui affirme que le nombre des actinomycètes est corrélé positivement avec le taux de la matière organique quelque soit le taux de la salinité du sol (Lee et Hwang, 2002). En fait, le nombre d'actinomycète isolés est inversement proportionnel au taux d'humidité des échantillons (Sykes et Skiuer, 1973; Basilio, 2003).

L'isolement sélectif des actinomycètes à partir de leur habitat, pose problème. En effet trop de substrats favorisent les champignons et les bactéries à croissance rapide et empêchent de ce fait un isolement facile des actinomycètes qui ont un temps de génération relativement long (Williams *et al.*, 1982 ; Crawford *et al.*, 1993).

Pour cela, le milieu Bennett a été utilisé dans cette étude. Le deuxième milieu sélectif utilisé pour l'isolement des actinomycètes est le milieu Olson, ce milieu le plus spécifique et le plus sensible aux actinomycètes contenant le sodium caséinate et l'asparagine favorisant la croissance des actinomycètes. Ce milieu a été utilisé par Hilali *et al.* (2002), qui ont trouvé que c'est le milieu le plus favorable pour la sélection des actinomycètes à partir du sol.

Plusieurs techniques ont été utilisées pour l'isolement sélectif des actinomycètes, elles reposent essentiellement sur le traitement à la chaleur des échantillons et l'addition aux milieux d'isolement des substances inhibitrices, stoppant la croissance des germes envahisseurs (Larpen et Sanglier, 1989; Ouhdouche *et al.*, 2001; Hilali *et al.*, 2002; Jung et Byung, 2002).

C'est cette dernière méthode que nous avons adoptée au cours de notre travail. Les avis concernant l'utilisation des antibiotiques sont cependant controversés. Selon **Porter et al. (1960)** la plupart des antibactériens utilisés inhibent beaucoup d'actinomycètes. En revanche, **Dulaney et al. (1955)**, **Williams et Davies (1965)**, recommandent l'utilisation d'un mélange d'antifongiques et d'antibactériens pour l'isolement des actinomycètes.

L'actidione (cyclohexémide) à 50-100 µg/mL, la piramicine et la nystatine à une concentration respectivement de 10 et 50 µg/mL sont les antifongiques les plus utilisés comme additifs dans les milieux d'isolements des actinomycètes (**Dulaney et al., 1955 ; Porter et al., 1960**).

La nystatine ajoutée au milieu a inhibé la croissance des champignons. **Williams et Davies (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il a inhibé leur croissance en majorité à une concentration de 50 µg/mL, en plus cet antibiotique lorsqu'il est testé sur les actinomycètes n'a pas altéré leur croissance même en augmentant sa concentration à 100 µg/mL.

Le milieu Olson a été complété d'actidione à 40 µg/mL qui permet d'éliminer les champignons antagonistes et favorisent le développement des actinomycètes et le propionate de sodium qui est un autre antifongique. Pour les deux milieux utilisés, nous observons une différence importante de la taille de la flore actinomycétale isolée entre les différents échantillons de sols malgré qu'ils soient tous riches en matières organiques et de pH proche de la neutralité. Cette différence peut être expliquée par la présence de substances inhibitrices dans certains de ces sols (**Zermane, 2008**).

Le mélange des antifongiques nystatine (50 µg/mL) et actidione (50 µg/mL) ajouté au milieu sélectif a permis d'éliminer presque la totalité de contaminants fongiques et bactériens indésirables. La nystatine est un antibiotique très efficace pour l'inhibition de la croissance des champignons. **Williams et Davies (1965)** ont testé cet antifongique sur des champignons isolés du sol, ils ont constaté qu'il inhibe la croissance de la majorité des champignons à une concentration de 50 µg/mL.

Le problème délicat lors de l'isolement des actinomycètes reste le développement des bactéries à coloration de Gram positive dont la croissance est envahissante, comme les bactéries du genre *Bacillus* qui forment des plages rendant toute observation et purification difficile voire, même, impossible. L'addition d'antibiotiques anti-Gram positif permet de réduire de façon considérable le nombre de ces bactéries, mais ces antibiotiques ne sont pas

sans effets sur les actinomycètes qui appartiennent au groupe des bactéries à coloration de Gram positive (Kitouni, 2007).

Plusieurs auteurs, à juste titre, considèrent que l'emploi d'antibiotiques est une précaution essentielle dans l'isolement des actinomycètes. D'autres, combinent un prétraitement chimique ou physique des échantillons avec l'addition des antibiotiques. Mais cette technique d'isolement influence considérablement la variation des genres actinomycètes isolés et peut être utilisée pour un isolement ciblé et spécifique de genre. À cet effet, **Larpen et Larpen-Courgaud (1997)** utilisent pour isoler les genres *Actinomadura*, *Microbispora*, *Microtetraspora* et *Streptosporangium* un milieu de culture complété avec 50 µg/ml de cycloheximide, 50 µg/ml de nystatine, 5 µg/ml de polymixine et 1-8 µg/ml de pénicilline. Afin de cibler le genre *Thermoactinomyces* ils utilisent un milieu supplémenté de cycloheximide à une concentration de 50 mg/ml et de 25 mg/ml de novobiocine. Enfin, pour obtenir les genres *Micromonospora* et *Nocardia* ils additionnent 75 mg/ml de cycloheximide et 75 mg/ml de nystatine au milieu de culture utilisé (Kitouni, 2007).

III. Identification de souches d'actinomycètes

L'identification morphologique, physiologique et biochimique a été effectuée sur les souches d'actinomycètes les plus actives sur les microorganismes pathogènes testés et les représentants de chaque groupe d'actinomycètes de forme identique.

III.1. Etude morphologique

La caractérisation des souches est basée sur les critères morphologiques figurants sur le tableau 24.

Tableau 24 : Résultat de l'étude macromorphologique et caractères cultureux de quelques souches actives.

N° de souche	Milieux de culture						Origine de la souche
	Bennett			Amidon-caséine			
	Couleur du MA	Couleur du MV	Pigments diffusibles	Couleur du MA	Couleur du MV	Pigments diffusibles	
476	Beige-blanc	Beige	Beige	Blanc	Beige	-	Sol oasis Laghouat
479	Gris	Jaune verdâtre	Beige	Gris-blanc	Beige	-	Sol oasis Laghouat
480	Blanc	Beige	Marron clair	Gris verdâtre	Beige	-	Sol oasis Laghouat
493	Beige foncé-blanc	Beige	Marron clair	Blanc	Jaune	-	Sol de Oued M'Zi-Laghouat
505	Blanc, Gris-rose /lavande	Rose-violet	Rose-Violet	Violet-blanc	Rose-violet	-	Sol de Forêt 03 (Tlemcen)
506	Blanc-orange	Orange-jaune	Orange	Blanc-beige	Beige	-	Sol de Forêt 02 (Tlemcen)
509	Gris-jaune	orange	Jaune	Blanc	Beige	-	Sol d'un montagne (Tlemcen)
511	Brun -noir	Noir	Brun-noir	Noir-blanc	Brun	Marron	Sol d'un montagne (Tlemcen)
512	Gris-blanc	Beige	Beige claire	Gris	Beige	-	Sol d'Oued El-Chouli

(MA) : Mycélium aérien, (MV) : Mycélium végétatif, (-) : Absence.

Après ensemencement sur les milieux gélosés Bennett et Amidon-caséine, les colonies des souches actinomycètes actives (précédemment décrites) apparaissent au bout de deux jours d'incubation à 28°C, les premiers signes de croissance consistent en l'apparition de colonies pâteuses. Au 14^{ème} jour la majorité des souches donnent des colonies poudreuses ou granuleuses de différentes couleurs de mycélium aérien (blanc, orange, beige, jaune, violet, marron, noir, gris ou vert).

L'observation de l'envers de la colonie, permet de déterminer la couleur du mycélium du substrat qui peut être beige, orangé, jaune, violet, noir, marron ou brun.

Les colonies sont opaques, de surface poudreuse, et adhèrent fermement au milieu de culture où elles forment une légère dépression et sont difficiles à mettre en suspension.

- **Sur milieu Bennett** (Figure 20)

Les souches 505, 506, 511 et 512 présentent des colonies circulaires, convexes (505 et 506), ou bossues (511 et 512), à bords réguliers, de taille moyenne allant de 1 à 6 mm.

Les souches 476, 479, 480, 493, 509 apparaissent sous forme de colonies irrégulières, en forme de cratère à bords filamenteux (476, 479), ou bossues à bords ondulés (480, 493, 509), de taille moyenne comprise entre 1 à 7 mm.

- **Sur milieu Amidon-caséine**

La souche 493 présente des colonies irrégulières, convexes, à bords ondulés. Tandis que les autres souches apparaissent sous forme de colonies circulaires dont les souches:

479, 505: Colonies bossues à bords réguliers.

480, 509 : Colonies en forme de cratère à bords ondulés et réguliers respectivement (Figure 20).

476, 506, 511, 512: Colonies convexes à bords réguliers, à l'exception de 476 qui présente des bords ondulés.

En général, la taille moyenne des colonies est comprise entre 1 à 5 mm.

La croissance la plus abondante pour les souches étudiées a été observée sur le milieu Amidon-caséine que sur le milieu Bennett où la croissance est modérée. Par contre l'élaboration de pigment diffusible a été remarquablement observée sur milieu Bennett que sur le milieu Amidon-caséine où à l'exception de la souche 511 qui a élaboré des pigments de couleur marron, les autres souches n'ont élaboré aucun pigment.

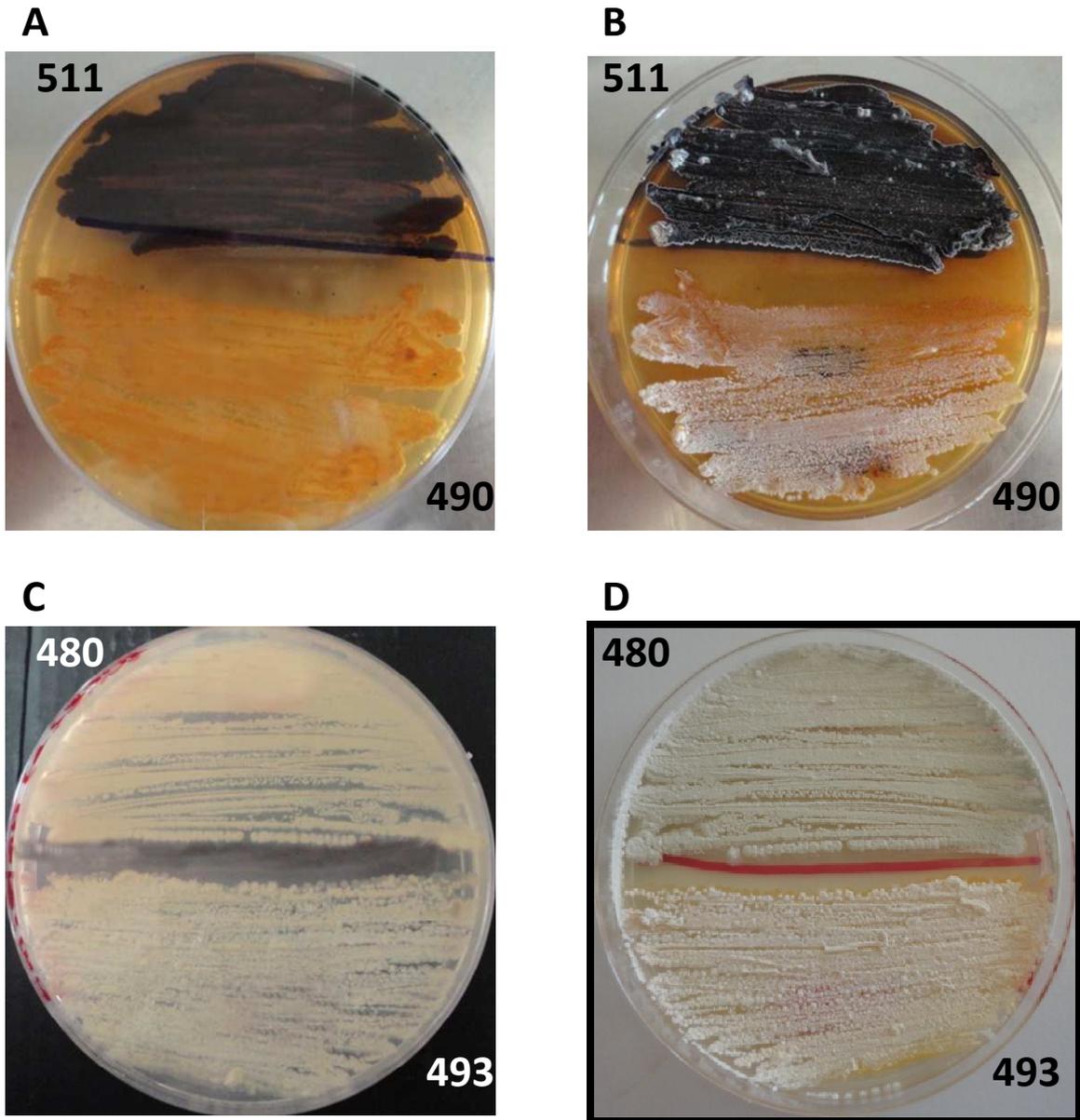


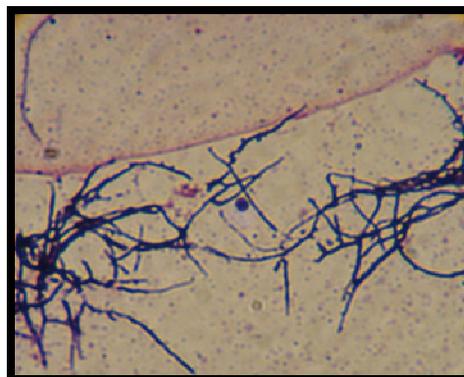
Figure 20: Aspect du mycélium végétatif et du mycélium aérien sur milieu Bennett (A, B) et milieu Amidon –caséine (C, D).

- **Résultat de la coloration de Gram**

Toutes les souches testées sont Gram positives comme le montre les photos ci-dessous.



Souche 512



Souche 506

Figure 21: Observation des souches actinomycetales (G× 1000) après coloration de Gram.

III.2. Micromorphologie

Les observations microscopiques des mycéliums aériens des souches mettent en évidence des hyphes fins, ramifiés, non septés. Les chaînes de spores portées à l'extrémité des hyphes sont droites de type rectiflexible. Les spores sont cylindriques et ne présentent aucune mobilité. Le mycélium végétatif quant à lui est long, très arborescent, non fragmenté et ne portant pas de spores (Figure 22).

Il est important de signaler l'importance de l'utilisation de plusieurs milieux de culture dans l'étude de la morphologie puisque l'observation des chaînes de spores ne s'effectue que sur les milieux donnant une bonne croissance (maturation complète) (**Shirling et Gottlieb, 1966**). Ainsi, on a remarqué qu'une bonne croissance après une période suffisante d'incubation permet une meilleure observation du mycélium aérien et de la forme des spores des souches.

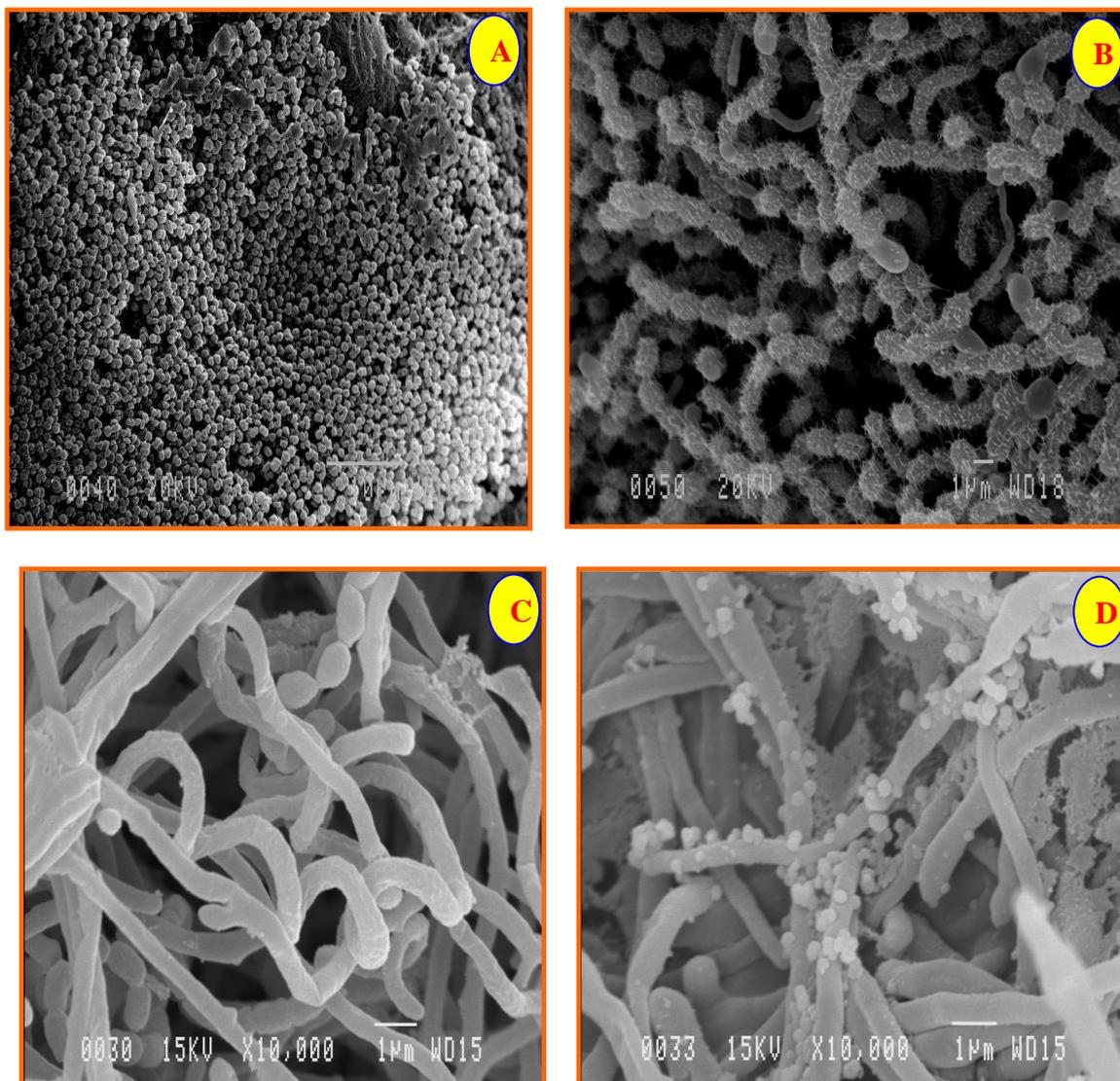


Figure 22: Observation des actinomycètes par microscope électronique à balayage ([A] : souche 469, [B] : souche 474, [C] : souche 484, [D] : souche 500).

III.3. Étude physiologique et biochimique

Les résultats des différents caractères physiologiques et biochimiques de quelques souches actinomycétales testées sont réunis dans le tableau 25. Ces résultats nous fournissent des éléments essentiels pour la classification de nos souches.

Tableau 25 : Caractéristiques biochimiques et physiologiques des souches actinomycétales.

Caractéristiques	Souches									
	T	476	479	480	493	505	506	509	511	512
Source de carbone										
Glucose	-	+	+	+	ND	+	+	ND	ND	ND
Lactose	-	+	+	+	ND	+	+	ND	ND	ND
Saccharose	-	+	+	+	ND	+	+	ND	ND	ND
Citrate	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+
Hydrolyse de la caséine	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+
Hydrolyse de l'amidon	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Hydrolyse de la gélatine	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Coagulation du lait écrémé	-	-	+	+	-	+	-	+	+	-
Peptonisation du lait écrémé	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+
Production de pigments mélanoïde sur le milieu ISP₆	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-
Réduction des nitrates	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+
Production d'H₂S	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Recherche de Catalase	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Dégradation de l'urée	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Production de l'indole	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-
Croissance en présence du NaCl :										
0 %	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3 %	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
5 %	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
6 %	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
7 %	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+
9 %	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
10 %	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+

(-) : Test négatif, (+) : Test positif, (T) : Témoin, (ND) : Non déterminé.

Les souches actinomycétales cultivées se développent sur les différentes sources de carbone étudiées, à l'exception de 479, 480, 505, 506 et 511 qui n'ont pas pu utiliser le citrate et 506 qui n'a pas hydrolysé l'amidon (Figure 23). Elles n'ont produits aucun pigment mélanoïde, alors que 493 et 511 ont élaboré des pigments mélanoïdes de couleur noire (Figure 24). De plus, elles montrent un métabolisme protéique important car toutes les souches hydrolysent la gélatine (Figure 25), mais pour la caséine, seulement 479 et 493 ne l'ont pas hydrolysé (Figure 26).



Figure 23: Hydrolyse de l'amidon par la souche 509.

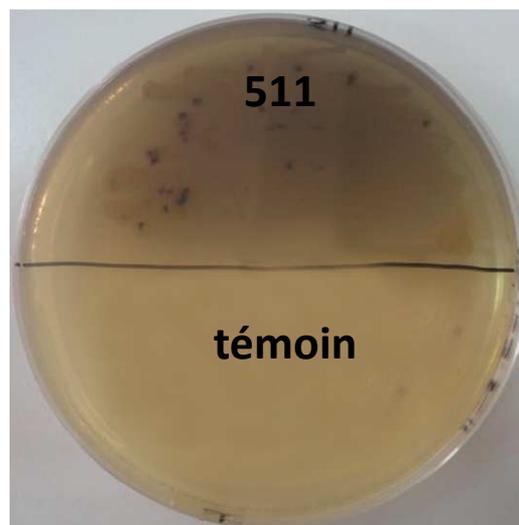


Figure 24: Production de pigments mélanoïdes par la souche 511.

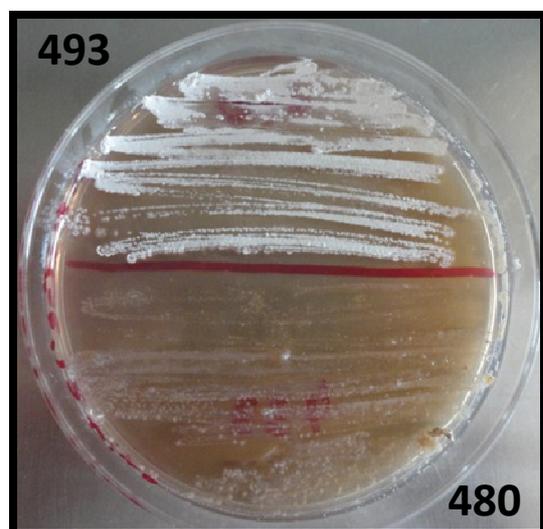


Figure 25: Hydrolyse de la gélatine par les souches 480 et 493.

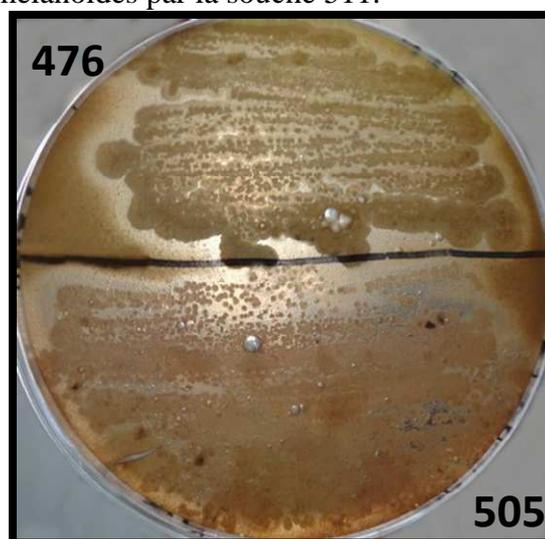


Figure 26: Hydrolyse de la caséine par les souches 476 et 505.

Les souches 479, 480, 505, 509 et 511 ont eu une action sur le lait écrémé représentée par la coagulation, alors que l'action du reste des souches sur le lait écrémé est représentée par la peptonisation.

Toutes les souches réduisent les nitrates en nitrites, à l'exception de 476, 479 et 506.

Toutes les souches sont catalase positives, ne produisent pas le soufre et ne dégradent pas l'urée. De même, elles ne produisent pas d'indole, à l'exception de 479 et 505.

Les souches 480, 511 et 512 tolèrent jusqu'à 10 % de NaCl, alors que 476, 479, 493, 505 et 509 tolèrent 7% de NaCl, cependant seulement 506 est inhibée dès la plus faible concentration de NaCl (3%).

En ce qui concerne la croissance à différentes températures, les résultats figurent dans le tableau suivant:

Tableau 26 : Croissance des souches actinomycétales à différentes températures.

Température de croissance	Souches Actinomycétales									
	Témoin	476	479	480	493	505	506	509	511	512
5°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30°C	-	+	++	++	+	++	++	+	+	+
37°C	-	++	+	+	++	+	+	++	+	++
55°C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(-) : pas de croissance, (+) : croissance abondante, (++) : croissance très abondante.

Le tableau illustre que la température optimale de croissance de nos souches se situe entre 30°C et 37°C. Cependant toutes les souches ne poussent pas à 5°C ni à 55°C.

- **Résultats de la sensibilité aux antibiotiques**

La croissance des souches actinomycétales est inhibée par la tétracycline (sauf les souches 479 et 512) et l'érythromycine, et non pas par l'acide nalidixique, la pénicilline, l'amoxicilline et l'ampicilline comme le montre la figure 27. Les résultats de l'antibiogramme des souches actinomycétales sont décrits dans le tableau 39 (annexe 6). Ainsi, la figure 27 présente le résultat de l'antibiogramme de la souche 480.

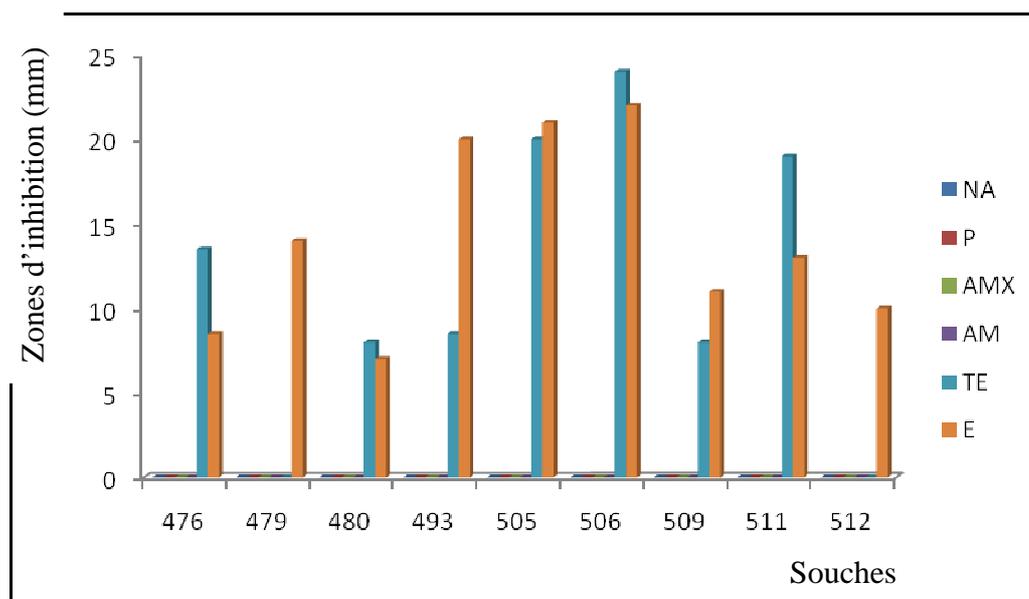


Figure 27: Distribution des diamètres des zones d'inhibition en fonction des antibiotiques testés sur les souches actinomycétales.



Figure 28 : Antibiogramme de la souche 480.

Selon leurs caractères étudiés, les neuf souches sélectionnées peuvent appartenir au genre *Streptomyces*.

L'étude des caractéristiques morphologiques, macroscopiques et microscopiques des souches actinomycetales est largement utilisée pour caractériser les genres des actinomycètes.

La plupart des souches développent des colonies après 48 heures d'incubation, c'est une caractéristique des actinomycètes à croissance rapide, en effet **Nodwel et Losick (1998)** ont constaté que les colonies de *Streptomyces coelicolor* érigent les hyphes aériens en 24 heures. Ces souches à croissance rapide peuvent être donc rapprochées au genre *Streptomyces*.

Selon **Shirling et Gottlieb (1976)**, l'identification des actinomycètes repose en grande partie sur les caractéristiques morphologiques qui sont considérées comme des caractères stables. Certains genres d'actinomycètes (*Streptomyces*, *Streptoverticillium*, *Micromonospora*, *Microbispora*...) peuvent être identifiées avec un plus grand degré de précision par rapport aux autres genres (*Nocardia*, *Actinomadura*...) par simple observation microscopique (**Williams et al., 1993**).

Après 14 jours de développement le mycélium aérien présente une gamme de couleur assez variée : blanc, orange, beige, jaune, violet, marron, brun-noir, gris ou vert. Ceci représente un critère de détermination du genre des *Streptomyces* (**Shirling et Gottlieb, 1966; Williams et Wallington, 1983; Sabaou, 1988**).

D'autres ont identifié des genres actinomycetales par observation des chaînes de spores au microscope optique (**Balagurunathan et al., 1996**).

Le mycélium est responsable de la formation des sporophores simples, qui produisent des chaînes de spores, cela a pu être observé au microscope optique où l'observation permet d'apprécier l'organisation de la chaîne de spores.

Toutes les souches actives développent un aspect poudreux ou granuleux correspondant au mycélium aérien. Le mécanisme de la morphogenèse a fait l'objet d'une étude réalisée par **Sprusansky et al. (2003)** et **Kim et al. (2005)** sur *Streptomyces coelicolor*, il s'est avéré qu'une fois les sources nutritionnelles du milieu sont épuisées, il y a libération de petites molécules à partir du mycélium du substrat, la libération de ces signaux chimiques déclenche un programme d'expression de gènes démontré par l'apparition d'un mycélium aérien.

En plus des caractères morphologiques, les colorations cellulaires, les caractères biochimiques et physiologiques sont d'une grande importance dans la caractérisation des genres d'actinomycètes avec une plus grande précision (**Boiron et al., 1993; Carlotti et al., 1994**).

Les pigments solubles sont produits par toutes les souches, ils sont de couleur beige pour les souches 476, 479 et 512 marron pour 480 et 493, rose-violet pour la souche 505, ou même orangée pour la souche 506 et jaune pour la souche 509.

Ces pigments peuvent être des substances bioactives, **Margalith (1992)** rapporte que les actinomycètes produisent des métabolites bioactifs pigmentés. **Horinouchi et Beppu (1994)** ont rapporté aussi que la streptomycine produite par *Streptomyces griseus* est un pigment jaune.

La souche 511 secrète un pigment brun noir qui est la mélanine, la production des pigments mélanoïdes est une caractéristique très importante pour les actinomycètes, **Shirling et Gottlieb (1972)** l'on considérés comme une clé pour la classification des *Streptomyces*. Selon **Margalith (1992)** la biosynthèse de la mélanine se fait par la voie de Raper-Mason avec la tyrosine comme substrat, la tyrosinase catalyse la réaction d'oxydation de la tyrosine en DOPA (dihydroxyphénilalanine) et en dopaquinone. Après une série de réaction d'auto-oxydation le produit final est l'acide 5,6-dihydroxyindol coloré en jaune, qui se condense pour donner la mélanine caractérisée par la couleur noir.

D'autre part, il est possible que certains pigments de couleur foncée masquent les autres pigments de couleurs plus claires qui sont produits simultanément, **Omura et al. (2001)** ont rapporté que le génome de *Streptomyces overmitilis* code pour 25 métabolites secondaires (mélanine, caroténoïdes, siderophores ...etc.).

La majorité de ces souches sont capables de métaboliser l'amidon et la caséine du lait, pour assurer la source de carbone et d'azote; par contre, uniquement deux souches (493 et 511) sont capables de produire des pigments mélanoïdes sur milieu ISP6.

Les critères de détermination que nous avons utilisés sont pris a partir des références bibliographiques : «**Girard et Rougieux, 1967; Kutzner, 1986; Prinzis, 1990; Lemriss, 2003; Taxonomie Outline of The Procaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriologie, (Garrity et al., 2004); Zermane, 2008; Dhanasekaran et al., 2005; Kitouni et al., 2005**».

D'après les tests morphologiques, physiologiques et biochimiques réalisés nos souches isolées à partir du sol se rapprochent plus du genre *Streptomyces*. En effet **Lechevalier et Lechevalier (1967)** ont montré que la fréquence de *Streptomyces* dans le sol d'après l'étude de 5000 échantillons issus de 16 sols différents est de 95,34%.

III.4. Identification de souches d'actinomycètes à l'aide de l'ADNr 16S

La séquence qui code pour l'ARN ribosomique 16S (ARNr 16S) est utilisée comme marqueur phylogénétique en raison de sa structure, très conservée dans toutes les bactéries. Il est constitué d'une succession de domaines conservés qui constituent des sites de complémentarité pour les amorces universelles, et d'autres portions de séquences propres à un groupe de bactéries, nommées séquences signatures.

Nous avons dans un premier temps extrait l'ADN génomique, en utilisant différentes méthodes (utilisant des enzymes lytiques ou un broyage dans l'azote liquide), puis amplifié l'ADNr 16S par réaction de polymérisation en chaîne (PCR). Nous avons utilisé pour la PCR trois paires d'amorces différentes : une paire d'amorces universelles des bactéries qui amplifie une région d'environ 1500 pb (27F et 1492R) (Rheims *et al.*, 1996), et deux paires d'amorces spécifiques des Actinobacteria, permettant d'amplifier respectivement des régions d'environ 600 et 300 pb : {Com2xf et Ac1186} et {ACT235 et ACT878} (Farris et Olson, 2007 ; Schäfer *et al.*, 2010). Le positionnement des amorces sur le gène de l'ARNr 16S est représenté sur la Figure 29.

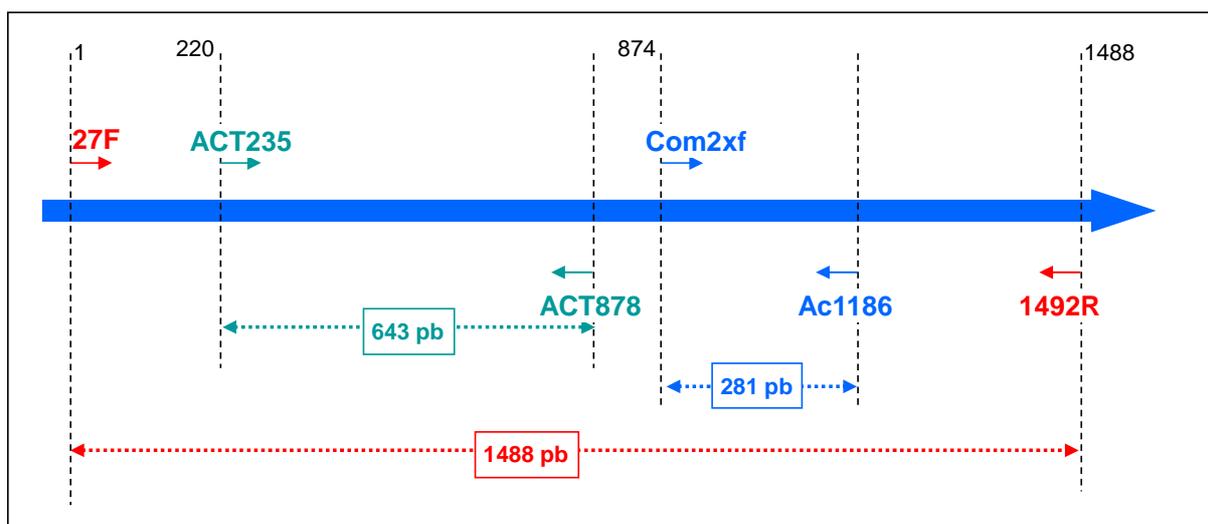
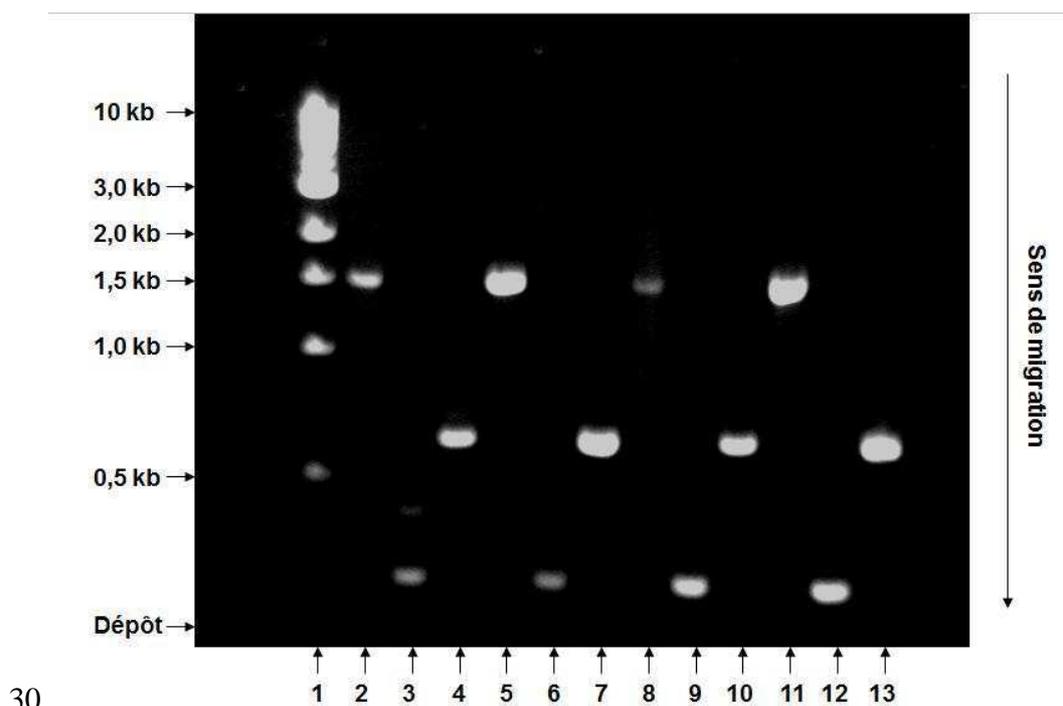


Figure 29 : Positionnement des amorces utilisées sur le gène de l'ARNr 16S (chez *Streptomyces coelicolor* A3(2)).

Les amplifications ont été contrôlées par migration électrophorétique sur gel d'agarose. Un exemple représentatif est montré sur la figure 30.



30.

Figure 30 : Résultats de la PCR après visualisation du profil de migration.

Le contenu de chaque puits est décrit dans le tableau 27 suivant.

Tableau 27 : Nature des échantillons déposés sur gel d'agarose (produits PCR des souches 474, 493 et 523).

Puits	Souche	Amorces utilisées	Type d'extraction
1	Marqueur		
2	474	27F et 1492R	Extraction par lyse enzymatique
3		Com2xf et Ac1186	
4		ACT235 et ACT878	
5	523	27F et 1492R	
6		Com2xf et Ac1186	
7		ACT235 et ACT878	
8	493	27F et 1492R	
9		Com2xf et Ac1186	
10		ACT235 et ACT878	
11	523	27F et 1492R	
12		Com2xf et Ac1186	
13		ACT235 et ACT878	

Les produits PCR montrent bien l'amplification d'un segment d'ADN de la taille attendue. Ces produits PCR ont été purifiés puis séquencés.

III.4.1. Interprétation des séquences d'ADN

Nous avons utilisés différents programmes d'analyses de séquences disponibles en ligne.

a) JaMBW

Nous avons obtenu à l'aide de plusieurs amorces ciblant le même gène, plusieurs régions différentes. Le but est de reconstituer la plus grosse séquence possible, avec des chevauchements des séquences de manière à limiter au maximum les erreurs de séquençage. Voici par exemple les séquences obtenues pour la souche 469 :

En Vert : le numéro de souche

En Bleu : le nom de l'amorce

En violet : le sens de lecteur du fragment

F = Forward (direct) R = Reverse (inverse)

> 469-2F_**Com2xf**F

TATTTCGACGCAACCGGAAGAACCTTTACCAAGGCTTGACATCGCCCGAAAGCATCAGAGATGGTGCCCCCTTGTGGTCGGGTGACAGGTGGTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGTGAGATGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTGTCTGTGTTGCCAGCATGCCCTTCGGGGTATGGGGACTCACAGGAGACTGCCGGGGTCACTACCG

> 469-3F_**ACT235**F

GACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCAACATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGGTGGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGA GCTCGTAGGGCGTCTGTACGTCCGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTGCATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGCGAAGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACCGTGAGGAGC GAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGAAGTGGTGTGGCGACATTCCACGTCGTCGGTGC CGCAGCTAACGCATTAAGTTCGCCGCTGGGAA

A l'aide de **JaMBW**, on renverse les séquences des Reverses puis on prend la séquence complémentaire pour les mettre dans le même sens de lecture que les autres.

> 469-3R_**ACT878**R

ACGTGGATGTTCGCCACACCTAGTTCACCGCTTACGGCGTGGACTACCAGGGTATCTAATCTGTTCGCTCCCCACGCTTTCGCTCCTCAGCGTCAAGTAATGGCCAGAGATCCGCTTCGCCACCGGTGTTCTCTGATATCTGCGCATTTCACCGCTACACCAGGAATTCCGATCTCCCTACCACA CTCTAGTCTGCCCGTATCGAATGCAGACCCGGGGTTAAGCCCGGGCTTTCACATCCGACGTGACAGACCCGCTACGAGCTCTTTACGCCCAATA ATTCCGACAACGCTTTCGCGCTACGTATTACCGCGCTGCTGGCAGTGTAGCCGGCGCTTCTTCTGAGGTACCGTACTTTCGCTTCTTCC CTGCTGAAAGAGGTTTACAACCCGAAGGCGTCACTCCCTACGCGCGTCTGCTGCATCAGGCTTTCGCCCATTGTGCAATATTCCCACTGCTGC CTCCCGTAGGAGTCTGGGCCGTGTCTCAGTCCAGTGTGGCCGGTCCCTCTCAGGCCGGTACCCGTCGTCGCTTGGTGTGAGTCTACCTCAC CAACAAGCTAAAGG

> 469-3R_**ACT878**R- (Séquence renversée avec JaMBW)

CCTTTAGCTTGTGGTGTAGGTAGAAGCTACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCTGAGAGGGCGACCGGCCACTGGGACTGAGACACGGC CCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGCACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACCGCGGTGAGGGATGACGGCCTTCGGGT TGTAAACCTTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGGTAAATACGTA GGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGGCTAAAGAGCTCGTAGGGCGTCTGTACGTCCGATGTGAAAGCCCGGGCTTAACCCCGGGTCTG CATTGCATACGGGCAGACTAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCTGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAACACCGGTGGC GAAGGCGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGG TGGGAAGTGGTGTGGCGACATCCAGT

> 469-2R_**Ac1186**R

ATGGCATGCTGGCAACACAGAACAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAAACATCTCACGACACGAGCTGACGACAGCCATGCACCACCT GTCACCCGACCACAAGGGGGCACCATCTCTGATGCTTCCGGCGATGTCAAGCCTTGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCGTCAATTAAGCCACAT GCTCCGCTGCTGTGCGGGCCCCGTCATTCCTATTGAGTTTAAAC

> 469-2R_**Ac1186**R- (Séquence renversée avec JaMBW)

b) CrustalW2

Le logiciel **CrustalW2** va maintenant analyser toutes les séquences précédentes sauf les séquences R qui n'ont pas été remises dans le bon sens. Le logiciel superpose les régions

identiques, ce qui permet de reconstituer une plus grande partie du gène. Voici la séquence finale obtenue :

> 469

```
CCTTTAGCTTGTTGGTGTAGGTTAGAAAGCTCACCAAGGCGACGACGGGTAGCCGGCCTGAGAGGGCGC
ACCGGCCACACTGGGACTGAGACACGGCCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGGAATATTGC
ACAATGGGCGAAAGCCTGATGCAGCGACGCCGCTGAGGGATGACGGCCTTCGGGTTGTAAACCT
CTTTCAGCAGGGAAGAAGCGAAAGTGACGGTACCTGCAGAAGAAGCGCCGGCTAACTACGTGCCA
GCAGCCGCGGTAATACGTAGGGCGCAAGCGTTGTCCGGAATTATTGGGCGTAAAGAGCTCGTAGG
CGGTCTGTCACGTCGGATGTGAAAGCCCCGGGGCTTAACCCCGGGTCTGCATTTCGATACGGGCAGAC
TAGAGTGTGGTAGGGGAGATCGGAATTCCTGGTGTAGCGGTGAAATGCGCAGATATCAGGAGGAA
CACCGGTGGCGAAGGCGGATCTCTGGGCCATTACTGACGCTGAGGAGCGAAAGCGTGGGGAGCGA
ACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAACCGGTGGGAACTAGGTGTGGCGACATCCACGT
CGTCGGTGCCGCAGCTAACGCAATTAAGTTCCCCGCTGGGAA
```

La partie bleue est issue de 469-3R_ACT878R (renversé) et la partie en vert est issue de 469-3F_ACT235F.

c) Blast

Blast compare la séquence finale à tous les génomes recensés à ce jour et donne le degré de similitude avec les espèces les plus semblables. Dans ce cas, on peut dire que la souche 469 a beaucoup de probabilité d'appartenir au genre *Streptomyces*. Les degrés de similitude avec plusieurs espèces de *Streptomyces* ne nous permettent pas de savoir à quelle espèce appartient précisément cette souche.

Sequences producing significant alignments:						
Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
NC_013929.1	Streptomyces scabiei 87.22, complete genome	1105	6632	98%	0.0	98%
NC_003155.4	Streptomyces avermitilis MA-4680, complete genome	1094	6566	98%	0.0	98%
NC_015953.1	Streptomyces sp. SirexAA-E chromosome, complete genome	1072	6433	98%	0.0	97%
NC_010572.1	Streptomyces griseus subsp. griseus NBRC 13350, complete genome	1066	6399	98%	0.0	97%
NC_003888.3	Streptomyces coelicolor A3(2) chromosome, complete genome	1038	6233	98%	0.0	96%
NC_015957.1	Streptomyces violaceusniger Tu 4113 chromosome, complete genome	1033	6194	98%	0.0	96%
NZ_CM001165.1	Streptomyces sp. Tu6071 chromosome, whole genome shotgun sequenc	1027	6167	98%	0.0	96%
NC_010617.1	Kocuria rhizophila DC2201, complete genome	922	2767	98%	0.0	93%
NC_008541.1	Arthrobacter sp. FB24 chromosome chromosome 1, complete sequence	917	4585	98%	0.0	93%
NC_014666.1	Frankia sp. Eu1c chromosome, complete genome	911	2734	98%	0.0	93%
NC_013093.1	Actinosynnema mirum DSM 43827 chromosome, complete genome	911	4557	98%	0.0	93%
NC_010407.1	Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus chromosome, complete ge	911	1823	98%	0.0	93%
NC_009480.1	Clavibacter michiganensis subsp. michiganensis NCPPB 382 chromosome,	911	1823	98%	0.0	93%
NZ_CH672413.1	Janibacter sp. HTCC2649 scf_1099316001559 genomic scaffold, whole g	905	1765	98%	0.0	93%
NC_015145.1	Arthrobacter phenanthrenivorans Sphe3 chromosome, complete genome	905	3623	98%	0.0	93%
NC_015125.1	Microbacterium testaceum StLB037, complete genome	905	1811	98%	0.0	92%
NC_014830.1	Intrasporangium calvum DSM 43043 chromosome, complete genome	905	1811	98%	0.0	92%
NC_014550.1	Arthrobacter arilaitensis Re117 chromosome, complete genome	905	5435	98%	0.0	93%
NC_009921.1	Frankia sp. EAN1pec chromosome, complete genome	905	2717	98%	0.0	92%
NC_012803.1	Micrococcus luteus NCTC 2665, complete genome	900	1800	98%	0.0	92%
NC_008711.1	Arthrobacter aureus TC1, complete genome	900	5402	98%	0.0	92%

Figure 31 : Comparaison du gène 16S sur Blast de la souche 469.

La démarche est répétée pour les autres souches et les résultats sont écrits dans le tableau suivant :

Souche	Caractéristiques
469	99% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces Exemple : - <u>Streptomyces phaeochromogenes</u> - <u>Streptomyces turgidiscabies</u> - <u>Streptomyces tauricus</u>
471	99% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces
474	99% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces Exemple : - Streptomyces macrosporeus - Streptomyces griseoflavus
480	99% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces
493	98% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces
510	98% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces Exemple : - <u>Streptomyces aureus</u> - <u>Streptomyces phaeochromogenes</u>
523	98% d'homologie avec un grand nombre d'espèces de Streptomyces Exemple : - Streptomyces goshikiensis strain - Streptomyces avidinii strain

Figure 32 : Tableau des résultats de l'identification des souches 469, 471, 474, 480, 493 et 510.

La technique d'identification par l'ADNr 16S a donc permis de savoir que toutes les souches étudiées sont des *Streptomyces* mais les % d'identité de séquence ne nous ont pas permis d'identifier les espèces.

La présence d'*Actinomadura* et de *Nocardia* dans les isolats est en étroite corrélation avec la technique utilisée (Larpent et Larpent-Gourgaud, 1997). Quant à l'absence des autres genres des isolats obtenus peut être expliquée soit par l'absence de ses genres dans les écosystèmes étudiés ou à cause des techniques d'isolement utilisées. Il a été rapporté que seulement 0,001-15 % de la population microbienne présente dans les échantillons environnementaux est cultivable (Amann *et al.*, 1995). Généralement, les spores des actinomycètes sont facilement cultivables à partir des échantillons environnementaux, cependant, la sélectivité due aux milieux de culture utilisés pour l'isolement peut affecter leur croissance (Goodfellow et Simpson, 1987). La caractérisation d'un organisme en terme de phylotype ne nécessite qu'une séquence génétique et non une cellule fonctionnelle. Par conséquent, les gènes ou fragments de gènes codant pour l'ARNr 16S peuvent être sélectivement amplifiés par PCR à partir de mélanges complexes d'ADN obtenus directement

d'échantillons environnementaux. Cette méthode permet alors de s'affranchir de l'étape de culture des microorganismes dans un but d'identification de ces derniers (Kitouni, 2007).

IV. Recherche de gènes codant un peptide lasso

Nous avons évoqué en introduction l'essor de l'approche génomique pour la découverte de métabolites secondaires d'intérêt. Cette approche a été particulièrement efficace pour identifier de nouveaux peptides lasso, peptides bioactifs produits notamment par les Actinobacteria (Maksimov et Link, 2013). Cette approche a été utilisée récemment par l'équipe du Professeur Sylvie Rebuffat et a permis de découvrir un nouveau peptide lasso produit par *Streptomyces sviceus*, la sviceucine. Dans notre cas, n'ayant pas accès aux génomes des souches isolées, nous avons examiné la possibilité de cribler ces souches pour la production de peptides lasso par PCR, en utilisant des amorces dégénérées conçues par rapport aux séquences protéiques des enzymes de maturation de ces peptides.

Les peptides lasso sont maturés à partir d'un précurseur linéaire issu de la voie de biosynthèse ribosomale, sous l'action de deux enzymes : une protéase et une lactame-synthétase (Duquesne *et al.*, 2007; Yan *et al.*, 2012). Chez *Streptomyces sviceus*, ces enzymes sont appelées respectivement SvicB et SvicC. Nous avons conçu des amorces pour amplifier la séquence d'ADN codant les domaines conservés de SvicB et SvicC (Figure 33), appelées 238, 240 et 242. Le couple d'amorces 238-240 est sensé amplifier un fragment de 323 pb, tandis que la paire 238-242 devrait permettre d'amplifier un fragment de 1757 pb. Le positionnement des amorces sur le système génétique de biosynthèse de la svicéucine est donné sur la figure 33.

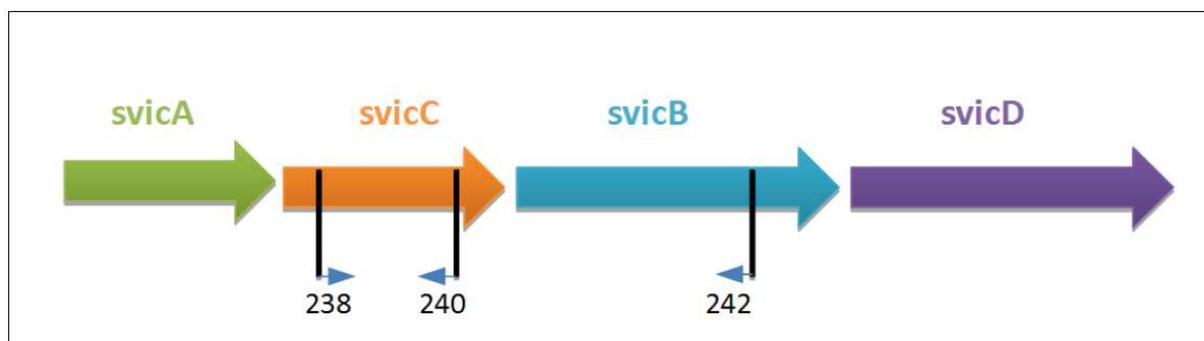


Figure 33 : Position des amorces sur le système génétique de *S. sviceus*. Le gène *svicA* code le précurseur, *svicB* et *svicC* codent les enzymes de maturation, et *svicD* code la protéine d'export.

Des essais de PCR ont d'abord été réalisés sur la souche de *Streptomyces sviveus* qui produit la svicéucine, afin de développer la méthode de PCR et de valider cette approche de criblage sur un contrôle positif. Toutefois, nous n'avons pas obtenu d'amplification en utilisant les deux paires d'amorces 238-240 et 238-242. Nous poursuivons ce travail en essayant d'optimiser les conditions de PCR, en particulier en essayant de diminuer la température d'hybridation. En parallèle, d'autres amorces moins dégénérées vont être conçues.

V. Recherche de molécules antibiotiques

Parmi les souches d'actinomycètes isolées, trente-huit souches sont sélectionnées en premier temps, selon trois critères: la pureté, les caractéristiques typiques et la vitesse de croissance. Ceux-ci afin d'étudier leur activité antimicrobienne.

En second temps après avoir réalisé le test d'activité antimicrobienne des souches actinomycétales sélectionnées contre les microorganismes cibles, un deuxième criblage a été fait et est basé sur le spectre d'activité antibactérienne et /ou antifongique relativement large vis -à -vis des germes cibles. À partir des trente- huit souches, neuf souches sont retenues (Tableau 28).

Tableau 28: Résultat de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar (en mm).

Code de la souche	Origine	<i>C. albicans</i>	<i>S.aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>Vibrio alginolyticus</i> CIP 103336	<i>E.coli</i> ATCC 8739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
469	E2	10	09	19	06 [§]	06	06
470	E1	10	06	11	06	06	06
471	E1	07	06	06	06	06	06
472	E1H	15	06	08	06	06	06
473	E1H	12	06	08	06	06	06
474	SB1	20	06	11	06	06	06
520	AE1	10	06	14	06	06	06
476	AE2	07	08	19	06	06	06
477	AE3	06	06	06	06	06	06
478	E1	06	14	14	06	06	06
479	AE4	07	12	20	06	06	06
480	AE5	06	09	20	06	06	06
521	OM1	00	06	06	06	06	06
482	OM2	06	06	08	06	06	06
483	AE6	07	06	10	06	06	06
484	E1	06	13	06	06	06	06
485	AE7	06	07	13	06	06	06
486	OC1	06	06	13	06	06	06
487	SB2	10	06	06	06	06	06
488	OC2	06	06	06	06	06	06
489	E5	10	07	12	06	06	06
490	E1	10	06	06	06	06	06
535	E5	10	07	09	06	06	06
492	OM3	10	06	06	06	06	06
493	OM4	21	06	06	06	06	06
494	AE8	06	06	06	06	06	06
495	OM5	06	06	06	06	06	06

/ : Test non réalisé ; § : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des cylindres d'agar).

Suite tableau 28: Résultat de l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes contre les microorganismes cibles déterminée par la méthode des cylindres d'agar (en mm).

Code de la souche	Origine	<i>C. albicans</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i> ATCC 9341	<i>Vibrio alginolyticus</i> CIP 103336	<i>E.coli</i> ATCC 8739	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853
522	AE12	08	17	20	06 [§]	06	06
497	E5	06	06	06	06	06	06
498	AE9	06	06	06	06	06	06
499	OM6	06	06	06	06	06	06
500	E1	00	16	06	06	06	06
501	E1	06	00	06	06	06	06
536	E.B.	10	06	06	/	06	06
530	E1	08	08	10	/	06	06
504	AE10	06	06	06	06	06	06
537	E3	06	08	13	/	06	06
506	E2	08	15	17	06	08	06
507	OC3	29	09	06	06	10	07
508	AE11	06	06	06	06	06	06
509	SB3	06	14	12	06	06	06
511	SB4	06	06	16	06	06	06
512	SB5	17	06	06	06	06	06
514	OC4	06	06	06	06	06	06
515	E1	06	06	06	06	06	06
516	E1	06	06	08	06	06	06
517	E4	06	06	13	06	06	06

/ : Test non réalisé ; § : Absence d'activité (06 mm est le diamètre des cylindres d'agar).

V.1. Méthode des cylindres d'agar

V.1.1. Test d'activité antibactérienne

Le spectre d'activité antibactérienne des souches d'actinomycètes retenues a été recherché par la méthode des cylindres d'agar vis-à-vis de trois souches de bactéries à Gram positif et deux souches bactériennes à Gram négatif (Tableau 28).

Les résultats montrent que les souches 476, 479, 505 et 509 présentent un spectre d'activité antibactérienne vis-à-vis des deux bactéries à coloration de Gram positive testées (*M. luteus* et *S. aureus*). Cependant la souche 511, n'est active que contre *M.luteus*.

Il ressort aussi du tableau 28 que la souche 506 montre une activité contre de toutes les bactéries testées, tandis que la souche 480 ne révèle aucune activité antibactérienne détectée contre *S. aureus* MRSA 43300 et *P. aeruginosa*.

En revanche les deux souches 493 et 512 ne montrent aucune activité antibactérienne.

V.1.2. Test d'activité antifongique

Le spectre d'activité antifongique des souches actinomycétales retenues d'origine terrestre a été testé contre *C. albicans* (souche résistante à la nystatine et l'amphotéricine (50 µg/ml).

Les résultats du tableau 28 illustrent que les souches 476, 479, 480 et 506 ont montré une faible activité contre *C. albicans* alors que les deux souches 493 et 512 présentent la plus forte activité antifongique avec des zones d'inhibition de 21 et 17mm, respectivement.

Alors que les trois souches 505, 509 et 511 ne révèlent aucune activité antifongique.

La figure 34 représente un exemple de zones d'inhibition données par la méthode des cylindres d'agar des souches d'actinomycétales contre *S. aureus* ATCC 6538 (Figure 34-A) et *C. albicans* (Figure 34-B).

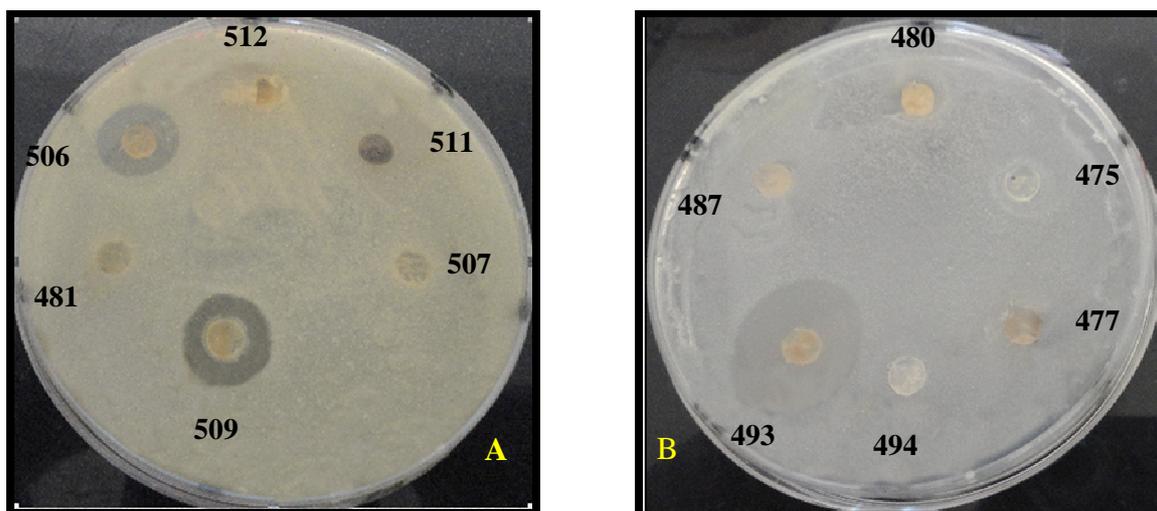


Figure 34 : Activité antimicrobienne des souches actinomycetales par la méthode des cylindres d’agar contre *S. aureus* ATCC 6538 (A) et *C. albicans* (B).

V.2. Méthode des puits

Concernant la méthode des puits aucune zone d’inhibition n’a été observée contre des germes cibles à l’exception de la souche *S. aureus* où il y a l’apparition d’une faible zone d’inhibition de 8 mm de diamètre obtenue par la souche 509. Les résultats des molécules de référence utilisées dans cette méthode figurent dans le tableau ci-dessous.

Tableau 29 : Résultat des molécules de référence utilisée dans la méthode des puits.

souches	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>S. aureus</i> MRSA 43300	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M.luteus</i> ATCC 9341	<i>E. coli</i> ATCC 8739	<i>C. albicans</i>			
molécules	Ampicilline					Nystatine	Eau distillé Stérile	Ampho- téricine B	Acétone
Zones d’inhibition (mm)	0	0	32	36	0	0	0	0	0

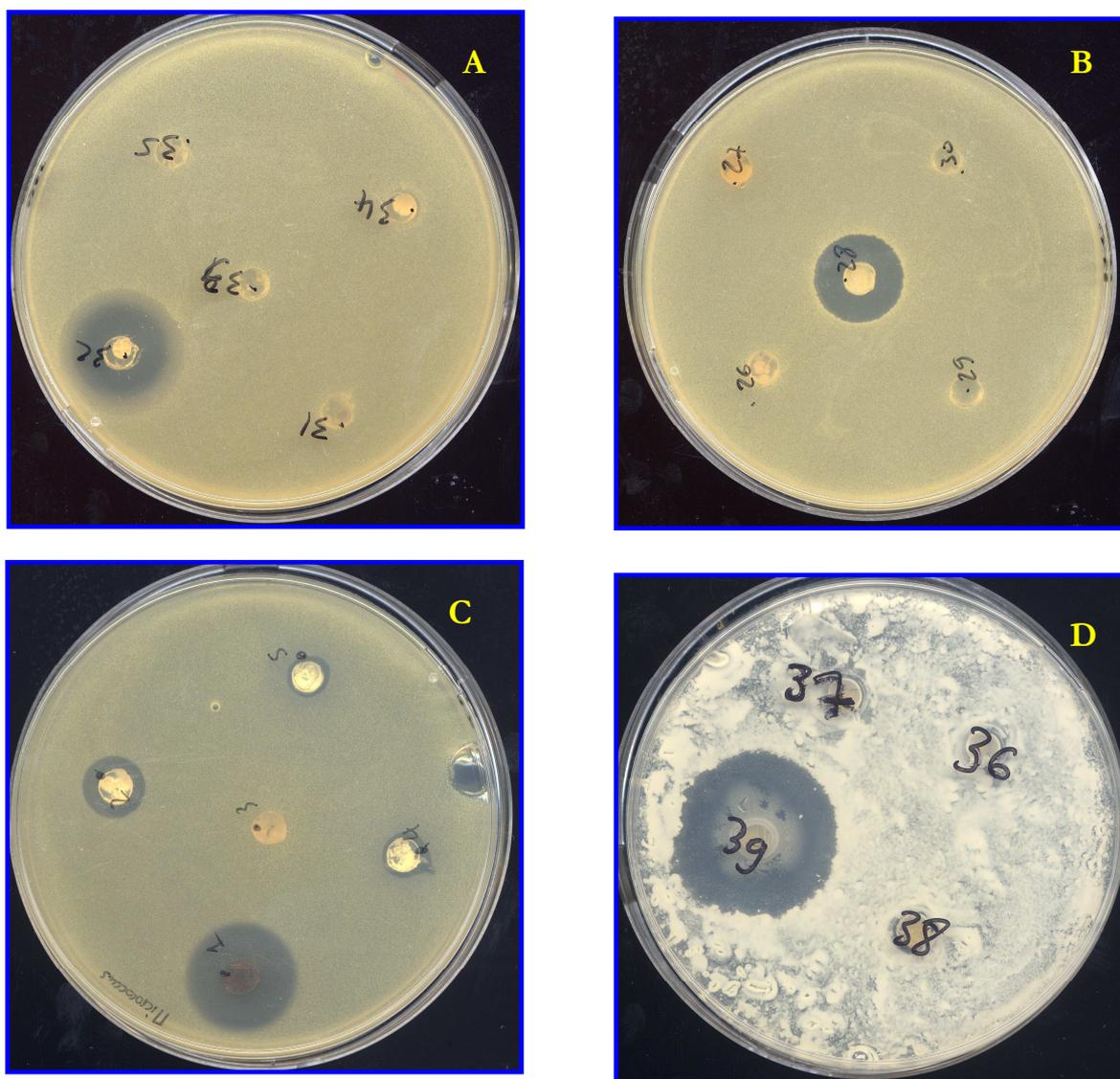


Figure 35 : Photos des tests d'activité antimicrobienne des actinomycètes sur les souches *Staphylococcus aureus* (A, B), *Micrococcus luteus* (C) et *Candida albicans* (D).

Les actinomycètes existent dans divers habitats en nature y compris le sol qui est considéré comme le réservoir principal de ces bactéries (Davies et Williams, 1970). Ils constituent une source intéressante de substances bioactives, notamment les molécules antimicrobiennes. Le criblage des souches d'actinomycète d'origine terrestre présente une nouvelle voie de recherche d'antimicrobiens naturels. La plupart des criblages concernant la recherche des substances antimicrobiennes à partir des souches d'actinomycètes ont été effectués sur des échantillons du sol.

Depuis, la découverte de la streptomycine par l'équipe de **Waksman** en **1943** à partir de bactéries du sol du genre *Streptomyces* et l'isolement de la nystatine, premier antibiotique antifongique, par **Hazen et Brown** en **1951** à partir de *Streptomyces noursei* provenant aussi du sol, plusieurs recherches ont été entreprises sur des souches d'actinomycètes d'origine terrestre. Différents types de sol (forêts, boue, lac), même des milieux extrêmes (désert), ont été explorés dans l'espoir de découvrir de nouvelles souches produisant des produits nouveaux (**Oswald et al., 1968; Hacène et al., 1994; Chiba et al., 1999; Hwang et al., 2001; Lee et Hwang, 2002 ; Meklat et al., 2011, Suela Silva, 2013**).

Dans ce cadre, un criblage de trente-huit souches d'actinomycètes d'origine terrestre a été effectué. L'activité antibactérienne et antifongique des souches d'actinomycétales isolées et purifiées a été mise en évidence par la technique des cylindres d'agar et la technique des puits. Les deux techniques sont des méthodes de diffusion en milieu gélosé.

Vingt-trois souches (60,5 %) parmi les trente-huit souches testées, ont montré une activité antimicrobienne contre au moins un des germes cibles testés (*M. luteus* ATCC 9341, *S. aureus* ATCC 6538, *E. coli* ATCC 8739, *P. aeruginosa* ATCC 27853, *C. albicans*). Ce pourcentage de souches actives se montre plus élevé par rapport à d'autres pourcentages de souches actives décrites dans des études de criblage concernant les souches d'actinomycètes isolées à partir du sol ou à partir du milieu marin. **Hacène et al. (1994)** ont trouvé que sur 286 souches d'actinomycètes isolées de différents écosystèmes du Sahara algérien, seulement 32 souches (11,19 %) ont montré une activité contre au moins un germe cible parmi quatre bactéries, deux levures et plusieurs champignons filamenteux. Dans les travaux de **Hilali et al. (2002)** les résultats d'un criblage initial de 85 souches d'actinomycète isolées à partir du milieu naturel (sol, eau et sédiments marins) montrent que 25 souches (29,41 %) ont une activité vis-à-vis au moins un des germes cibles suivants : bactéries et/ou des champignons pathogènes (*Candida albicans*, *Candida tropicalis* R₂, *Fusarium culmorum*, *Fusarium graminearum*).

Nos résultats indiquent que les isolats d'origine terrestre, comme ceux d'origine environnementale, sont une source potentielle intéressante de substances antimicrobiennes.

On note l'intense activité antimicrobienne de la souche 506, qui a montré une activité inhibitrice vis-à-vis de toutes les bactéries et la levure.

En outre, les résultats de ce screening montrent aussi que l'activité antimicrobienne des souches d'actinomycètes testées dépend de la méthode utilisée (**Lemriss, 2003**). Ainsi, nos résultats montrent aussi une différence du nombre de souches actives en fonction de la méthode utilisée. Il s'est révélé que par rapport à la méthode des puits, la méthode des

cylindres d'agar se prête mieux à la détermination de la sensibilité des souches microbiennes aux molécules bioactives produites par les souches d'actinomycètes testées.

Les résultats ont prouvé que seize actinomycètes ont une activité contre *M. luteus* avec un diamètre de zones d'inhibition entre 08 et 20 mm. Les travaux de **Fourati-Ben Fguira et al. (2005)**, ont montré que les *Streptomyces* isolés du sol d'Oasis Tunisien possèdent une activité inhibitrice entre 21 et 32 mm sur ce germe. Par contre, une souche de *Streptosporangium* isolée du sol du Sahara algérien a révélé des zones d'inhibition de 41 mm et les fractions du surnagent purifié par HPLC ont montré des zones d'inhibition entre 26 et 34 mm (**Boudjella et al., 2006 ; Boudjella et al., 2007**).

De même, nos résultat montre que *S. aureus* est résistante aux molécules secrétées par les actinomycètes (à l'exception de la souche 506) avec une sensibilité intermédiaire à l'ampicilline, par contre *S. aureus* ATCC 6538 présente des zones d'inhibition qui varient de 07 à 15 mm. **Şahin et Uçur (2003)**, ont isolé des souches de *Streptomyces* du sol de la Turquie avec une activité vis-à-vis de *S. aureus* de 11 à 30 mm. Des souches d'actinomycètes du même origine révèlent une inhibition entre 08 et 16mm (**Oskay et al., 2004**).

La souche à Gram négatif, *E. coli* présente aussi une résistance à l'exception de deux souches d'*Actinomycetales* 480 et 506 avec des zones d'inhibition de 08 et 10mm, respectivement. Des résultats similaires sont mentionnés par **Şahin et Uçur (2003)** où deux souches parmi les 15 souches de *Streptomyces* isolées du sol sont actives avec des zones d'inhibition entre 10 et 20 mm de diamètres. Le même résultat est rencontré dans les travaux de **Oskay et al. (2004)** où sur un total de 17 souches d'actinomycètes isolées du sol de Turquie, seulement deux souches étaient actives sur *E. coli*, avec des diamètres d'inhibition entre 15 et 26 mm.

Selon les tests d'évaluation de l'activité antibactérienne, l'espèce la plus résistante était *P. aeruginosa*. Les travaux de **Şahin et Uçur (2003)**, coïncident avec nos résultats. De même **Boudjella et al. (2006)** ont remarqué une absence d'effet de la souche *Streptosporangium* sur *P. fluorescens*. Les résultats de l'effet de substances bioactives produites par des actinomycètes isolés à partir d'échantillons d'eau, de sol et d'écorces d'arbres du nord-est de l'Algérie montrent que deux souches parmi les 14 testés sur *P. aeruginosa* par la méthode des disques (3mm) présentent des zones d'inhibition supérieurs à 3mm (**Kitouni et al., 2005**).

L'évaluation, de l'activité anti-*Candida* révèle des zones d'inhibition entre 07 et 21 mm pour 10 souches parmi les 38 testés (26,3%). D'après les résultats des expériences réalisées par **Lemriss et al. (2003)** par la méthode des cylindres d'agar et la méthode des puits (3mm), on note que parmi les 110 actinomycètes d'origine clinique, 42 (soit 38%) sont actives contre

C. albicans CIP 884.65 avec des diamètres des zones d'inhibition qui varient entre 03 et 52 mm. De même **Slavica et al. (2005)** ont mentionné que des souches appartenant au genre *Streptomyces* montrent des zones d'inhibition (11- 31mm) vis-à-vis de *C.albicans* ATCC10231.

Plusieurs études ont également montré une grande variabilité des résultats des tests d'activité antifongique en fonction de la méthodologie (**Cadet et al., 1996; Kauffman et Carver, 1997; Kang et al., 2010 ; Mendes et al., 2013**).

En se basant sur leurs origines, l'activité antibactérienne des actinomycètes représentent un pourcentage de 31,2% pour les souches isolées de Laghouat et 54,5% pour les souches isolées de Tlemcen, alors que l'activité antifongique occupe un taux de 37,5% pour les souches isolées de Laghouat et 18,2% pour celles isolées de Tlemcen. D'après **Kattere et Andren (2001)**, le nombre et l'activité des microorganismes changent d'une région à une autre, influencé par le contenu de matières organiques du sol, la texture du sol, le pH, l'humidité, la température, l'aération et d'autres facteurs.

V.3. Fractionnement des extraits et suivi bioguidé

Les extraits de mycélium (issus de cultures sur milieu gélosé Bennett) des souches 469, 473, 474, 478, 484 et 500 ont été fractionnés par chromatographie d'exclusion (gel de Sephadex LH20). L'activité antimicrobienne a été mesurée pour les différentes. En parallèle, ces fractions ont été analysées par couplage chromatographie liquide -spectrométrie de masse (LC-MS). Ces fractionnes se sont montrées actives contre des bactéries à Gram positif avec des valeurs de diamètres d'inhibition comprises entre 9 et 25 mm (Tableau 30). En revanche, ils sont inactifs contre toutes les bactéries à Gram négatif testées.

Tableau 30 : Activités antibactériennes (diamètres d'inhibition en mm) des fractions LH20 issues des souches actives de *Streptomyces* sp.

Fraction	Souche de <i>Streptomyces</i>	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i> ATCC 9341
51	469	16	15
52	469	14	11
55	473	14,5	14
56	473	14	09
57	473	/	/
58	474	11	25
59	474	12	16
65	478	11	/
66	478	10	/
67	484	12	/
70	500	13	12
71	500	10	/
Contrôle positif	Chloramphénicol	31	40
	Kanamycine	20	20

Les profils LC-MS de la première fraction LH20 de chaque souche sont donnés sur la Figure 36. Ces profils montrent la complexité des fractions, qui rend difficile d'attribuer l'activité mesurée à un composé.

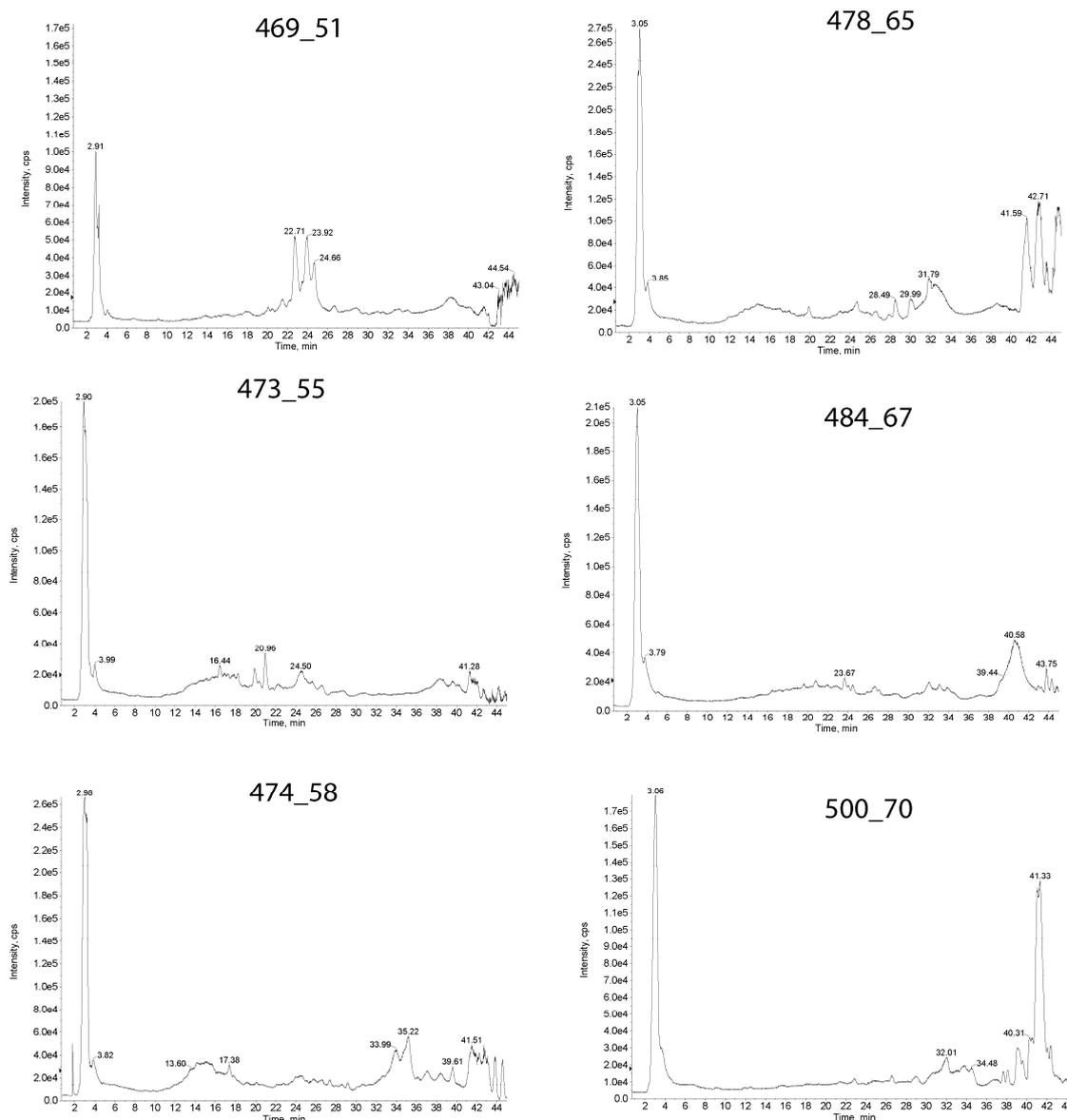


Figure 36: Profils LC-MS (courants ioniques totaux) des premières fractions de chromatographie d'exclusion LH20, pour chaque souche sélectionnée.

Une seconde étape de fractionnement a été conduite par chromatographie liquide haute performance (HPLC) de phase inverse, sur une colonne de type C18. Encore une fois, les fractions ont été analysées d'une part pour leur activité antibactérienne, et d'autre part pour leur profil LC-MS. Les résultats sont donnés ci-dessous pour la souche 500.

Tableau 31 : Activités antibactériennes (diamètres d'inhibition en mm) des fractions HPLC issues des souches actives de *Streptomyces* sp.

Fraction	<i>S. aureus</i> ATCC 6538	<i>M. luteus</i> ATCC 9341
44	7	7
45	7	6,5
46	7	7
47	0	0
48	9	6
Contrôles positifs chloramphénicol kanamycine	31	40
	20	20
Contrôles négatifs 25% acétonitrile 60% acétonitrile	0	0
	0	0

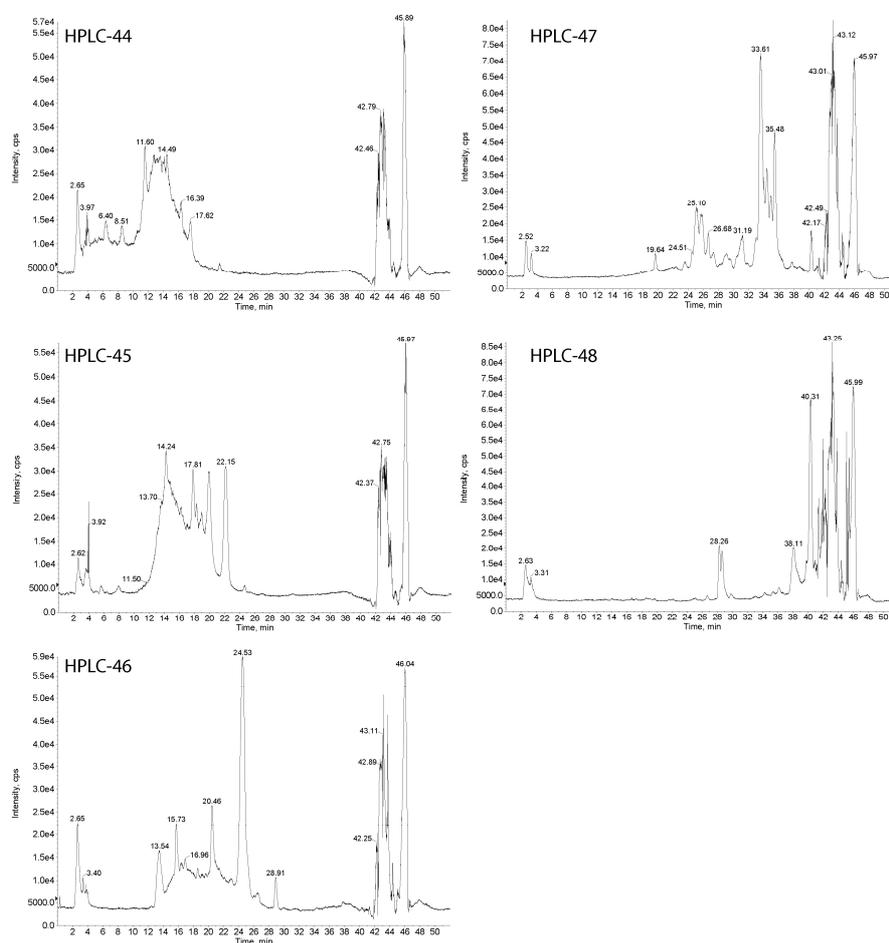


Figure 37: Profils LC-MS (courants ioniques totaux) des fractions HPLC issues des extraits de mycélium de la souche 500.

Ces profils LC-MS sont encore assez complexes et illustre la diversité des métabolites secondaires extraits du mycélium de *Streptomyces*. Les ions détectés par LC-MS pour la souche 500 sont de petit m/z (le plus souvent inférieur à m/z 500), ce qui indique que l'activité serait plutôt due à une petite molécule antibiotique. Quelques ions de plus haut m/z ont été détectés : des ions de m/z entre 1100 et 1200 chargés deux fois, indiquant des masses moléculaires de l'ordre de 2000-2500 Da (fraction 46), et des ions de m/z 601 (fraction 45). La fraction 47, non active, contient des composés de masse moléculaire entre 900 et 1200 Da ainsi que des composés présentant un profil isotopique indiquant la présence de l'élément chlore. Ainsi, ces composés chlorés ne semble pas avoir une activité antibactérienne.

Le fractionnement devra être poursuivi de façon plus fine afin d'isoler les composés responsables de l'activité antibactérienne et les identifier.

Chapitre II : Les bactéries lactiques

Chapitre II.

Les bactéries lactiques

I. Introduction

Des bactéries lactiques présentant des propriétés antibactériennes ont été isolées à plusieurs reprises de produits laitiers traditionnels variés tels que le beurre traditionnel “*Shmen*” (Kacem, et Karam, 2006), le *Jben* (Ouadghiri *et al.*, 2005) ou encore *El-Klila* (Boubekri et Ohta, 1996).

Dans la plupart des ateliers de la production Algérienne, la fabrication de ces produits s’effectue actuellement à petite échelle avec ou en absence d’une fermentation spontanée. L’ensemble des étapes de production apporte des flores microbiennes qui participent aux bons déroulements des processus de fabrication. Les produits sont essentiellement consommés sur place ou à proximité du lieu de production avec des qualités différentes d’un atelier à un autre. La recette et les paramètres techniques de la fabrication de ces produits varient d’une région à une autre. Ceci est dû à des traditions et savoir-faire transmis de génération en génération et il explique la grande variabilité de la qualité sensorielle des produits laitiers traditionnels de notre pays.

II. pH des produits laitiers traditionnels

La valeur moyenne du pH des produits laitiers traditionnels reporté dans le tableau 32 varie entre 3.92 et 6.38. La Klila serait légèrement plus acide que les Zebda, Dhan et Jben. Cette acidité peut être expliquée par l’activité des bactéries lactiques, ce qui est comparable à celle reportée par Lahsaoui (2009). D’autre étude réalisée par Mennane *et al.* (2007) a montré une valeur moyenne similaire de 4.14 pour sept échantillons de la Klila Marocaine.

Selon les travaux de **Kacem et Karam (2006)**, les analyses du pH de produit laitier “Smen” du lait de chamelle de quatre wilayas d’Algérie ont présenté des valeurs qui varient entre 3,10 et 4,87.

Pour le cas du Jben, la différence de la valeur du pH trouvée 6,38 par rapport aux autres produits laitiers étudiés peut être due à plusieurs facteurs tels que la méthode et la date de préparation, l’origine du lait et la nature de l’alimentation donnée aux animaux (**Ouadghiri, 2009**).

Tableau 32: pH et dénombrement des bactéries dans les produits laitiers traditionnels.

Produit	pH	Charge (UFC/g)				
		MRS _{28°C}	M17 _{28°C}	MRS _{45°C}	M17 _{45°C}	PCA _{30°C}
E ₁ : Zebda	4,55	10 ⁶	10 ⁶	5x10 ⁴	2,4x10 ⁵	2,2x10 ²
E ₂ : Dhan	4,71	6x10 ²	8x10 ²	2x10 ²	4x10 ²	4x10 ⁷
E ₃ : Dhan	5,03	2x10 ⁴	3x10 ⁴	2,4x10 ⁴	2,7x10 ⁴	1,8x10 ⁸
E ₄ : Klila	3,92	10 ⁹	9 x10 ⁸	1,1 x10 ³	3,6 x 10 ³	3x10 ³
E ₅ : Klila	4,02	10 ⁴	10 ³	2x10 ²	2,9 x10 ³	1x10 ⁸
E ₆ : Klila	4,43	3,15x10 ⁸	3,18x10 ⁸	10 ⁵	7x10 ⁶	5,09x10 ⁷
E ₇ : Jben	6,38	3,4x10 ⁷	5x10 ⁷	2,9 x10 ⁷	4,6x10 ⁷	3,47x10 ⁷
E ₈ : Zebda	4,71	10 ²	5x10 ²	10 ²	10 ²	3x10 ¹

Concernant le dénombrement, le nombre total de bactéries lactiques comptées sur MRS et M17 varie entre 10² et 9x10⁸ UFC/g par boîte (Tableau 32). Ce résultat est en accord avec les travaux de **Ouadghiri (2009)** sur dix-sept échantillons du fromage blanc traditionnel (Jben) du Maroc où les valeurs trouvées sont de 10⁸ à 10⁹ UFC/g.

Les nombres les plus élevés de colonies sont obtenus pour la Klila (E4) à raison de 9.10⁸ UFC/g dans le milieu M17 et 10⁹ UFC/g) dans le milieu MRS à 28°C. Alors, Les plus faibles nombres sont enregistrés pour la Zebda (E8) sur les milieux PCA (3.10¹ UFC/g) et MRS (10² UFC/g) et pour le Dhan (E2) sur le milieu MRS (2.10⁷ UFC/g) à 45°C.

L’amplitude des variations du nombre moyen de colonies obtenu dans nos échantillons est importante et ceci quel que soit le milieu utilisé et la température d’incubation. Ce nombre est plus important sur les milieux M17 et MRS que sur le milieu PCA à l’exception des échantillons du Dhan (E2 et E3) et de Klila (E5). Les valeurs de flores microbiennes dénombrées sur le milieu PCA sont plus élevées par rapport aux résultats reportés par **Mennane et al. (2007)**, où la Klila et le Jben ont révélé des charges de l’ordre de 4.10⁶ et 7.5 10⁴ UFC/g, respectivement.

Le faible niveau de microflores totales (Flore mésophile aérobie revivifiable) dans la plupart des produits étudiés est similaire aux résultats réalisés en Maroc sur des échantillons de Klila (**Mennane et al., 2007**), en Burkina Faso sur un lait fermenté traditionnel appelé Fulani et en Algérie sur des produits laitiers traditionnels tels que “Shmen” (**Kacem et Karam, 2006**) et *Zebda, Klila et Jben* (**Gaoui et Souida, 2009**). Cette variabilité peut être attribuée aux conditions de production et aux conditions climatiques qui diffèrent selon les régions.

Cette légère diminution du nombre de la flore mésophile totale serait due à un effet inhibiteur des acides organiques produits. Selon **Bourgeois et Larpent (1996)**, la croissance des lactobacilles est favorisée par des pH de 6,4 à 5,5 mais elle est limitée avec des pH inférieurs à 4,5 (plus acide).

La connaissance de la composition microbienne du lait est d'un intérêt particulier pour les agriculteurs et les transformateurs du lait. En effet, le lait dans les cellules du pis est stérile (**Tolle, 1980**), mais la glande mammaire, la peau du pis (**Brisabois et al., 1997**), le matériel de la traite, la litière, la qualité de l'air et les pratiques des éleveurs (**Sevi et al., 1998; Ménard et al., 2004**) sont des sources de contamination. La colonisation du lait par des microorganismes n'a été que partiellement décrite. Seuls les microorganismes pathogènes ont été souvent considérés (**Wareing, 2005**).

Le milieu MRS (**de Man et al., 1960**), est un milieu complexe et très riche, il est couramment utilisé pour cultiver les bactéries lactiques auxotrophes. Cependant, ce milieu contient des sources en osmoprotectants (extraits de levure, extraits de viande, peptones) pouvant minimiser l'impact des stress, notamment celui du stress salin (**Baliarda, 2003**).

Il faut noter que ces résultats obtenus par des méthodes conventionnelles ne sont représentatifs que de la flore cultivable. Or, il a été estimé que dans certains écosystèmes, moins de 1% des micro-organismes sont cultivables (**Amann et al., 1995**). Le passage par une étape de culture engendre donc la non détection des bactéries viables mais non cultivables et des bactéries qui pourraient être cultivées si un milieu approprié était disponible (**Duthoit et al., 2003**).

III. Isolement des bactéries lactiques

Les isolats qui ne présentaient pas les caractéristiques phénotypiques des bactéries lactiques (Gram positif, catalase négative et oxydase négative) ont été rejetés. Les 20 colonies sélectionnées et purifiées sont de taille variable, de forme circulaire avec un pourtour régulier ou irrégulier ou érodé et de couleur blanche, jaune ou blanc-crème (Figure 38).

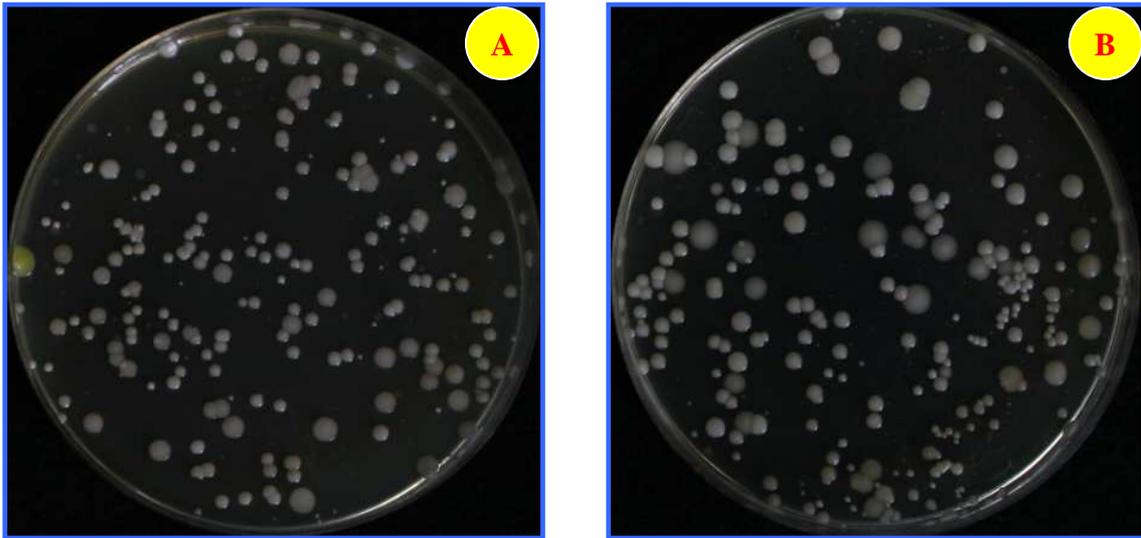


Figure 38: Photos des boîtes d'isolement des bactéries lactiques [A]: M17 B.L.B. 10^{-1} .45°C, [B]: MRS B.L.B. 10^{-1} .45°C.

Le tableau 33 illustre les origines, les codes et les milieux d'isolement des souches lactiques.

Tableau 33: Codes et origines des bactéries lactiques isolées.

Code de la souche	Milieu d'isolement	Origine
437	MRS.10 ⁻¹ .28°C	<i>Beurre</i> de brebis (Laghouat)
438	M17.10 ⁻¹ .28°C	
439	M17.10 ⁻¹ .28°C	<i>Beurre</i> de vache (Laghouat)
440	M17.10 ⁻¹ .42°C	
441	MRS.10 ⁻¹ .42°C	
442	M17.10 ⁻³ .28°C	
443	M17.10 ⁻³ .42°C	<i>Beurre</i> de Brebis (Adrar)
444	MRS.10 ⁻¹ .42°C	
445	MRS.10 ⁻³ .28°C	
447	M17.10 ⁻² .28°C	
449	MRS.10-1.45°C	<i>Beurre</i> de vache (Méchria)
451	MRS.10 ⁻³ .45°C	<i>Klila</i> de vache (Méchria)
452	MRS.10 ⁻⁴ .28°C	
453	MRS.10 ⁻⁵ .45°C	
454	M17.10 ⁻⁵ .28°C	<i>Jben</i> de vache (Méchria)
455	MRS.10 ⁻⁵ .28°C	
456	MRS.10 ⁻⁵ .28°C	
457	M17.10 ⁻³ .45°C	
458	M17.10 ⁻³ .45°C	
459	M17.10 ⁻³ .45°C	

IV. Identification phénotypique et génotypique des bactéries lactiques isolées

L'observation microscopique a révélé deux formes de cellules : coques et bâtonnets. Les souches sont Gram positif, immobiles, catalase négative, peroxydase négative et nitrate réductase négatif.

Après 48h d'incubation, il a été remarqué un virage de l'indicateur coloré dans le milieu de culture du pourpre au jaune pour les tests positifs. Ce virage est attribué à la production d'une quantité plus ou moins forte d'acide lactique par les souches en utilisant les sucres fermentescibles (Tableau 40, annexe 7).

Les 20 isolats provenant de produits laitiers traditionnels ont été identifiés par API 50CHL d'après le tableau 34.

Nous remarquons la présence d'une grande diversité d'espèce, nous citons : 3 *Leuconostoc mesenteroides*, 1 *Lactococcus lactis*, 1 *Weissella paramesenteroides*, 2 *Lactobacillus plantarum*, 2 *Enterococcus faecium*, 3 *Enterococcus durans* et 8 *Enterococcus faecalis*.

L'approche par le biais des profils de fermentations des carbohydrates n'a pas été concluante, la base de données fournie par l'industriel n'est restreinte qu'à l'identification de certains genres affiliés à la famille des bactéries lactiques. Les résultats d'identification en se référant à cette base de données ne sont pas satisfaisants, les valeurs de typicité ainsi que les probabilités obtenues font l'objet d'incertitude avérée et l'incohérence de ces résultats avec ceux obtenus par le biais de la génomique remettant en cause la fiabilité de la base de données consultée.

Tableau 34 : Identification des espèces via la base de données fournie avec les galeries API 50 CHL (Application API 50 CH, V.5.1).

n° souche	Identification	Probabilité	Typicité
437	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>dextranum</i>	0,995	0,21
439	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,87	-0,42
440	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	0,633	-0,18
441	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,633	-0,5
442	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,633	-0,17
443	<i>Lactobacillus plantarum</i>	0,747	0,36
444	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	0,596	0,16
446	<i>Lactobacillus brevis</i>		0,89
448	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	0,94	0,52
449	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	0,69	0,5
452	<i>Lactobacillus paracasei</i> ssp <i>paracasei</i>	0,788	0,27
453	<i>lactobacillus rhamnosus</i>	0,688	0,16
454	<i>Leuconostoc lactis</i>	0,664	0,43
455	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> ssp <i>dextranum</i>	0,9	0,4
456	<i>Lactococcus lactis</i>	0,536	0,9
457	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	0,534	0,68
458	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	0,534	0,68
459	<i>Lactococcus lactis</i> ssp <i>lactis</i>	0,534	0,35

L'évolution des techniques moléculaires a permis d'améliorer l'identification des germes pathogènes, d'altération ou les flores technologiques des produits alimentaires. Il est donc souhaitable d'utiliser simultanément à l'approche conventionnelle, des méthodes moléculaires directes basées sur la PCR afin d'identifier les isolats.

Les identifications ont été effectuées par le séquençage et la comparaison des séquences obtenues aux banques de données internationales de l'extrémité 5' de l'ADN ribosomique codant pour l'ARN ribosomique 16S (ADNr 16S). Plus de 600 paires de bases ont été analysées par génome.

En taxonomie, l'identification et l'affiliation de micro-organismes est basée principalement sur la comparaison de gènes homologues, c'est-à-dire descendant d'un ancêtre commun et ayant conservé une fonction identique au cours du temps. L'approche génomique que nous avons établi par le biais de l'amplification et du séquençage du gène codant pour l'ARN 16S nous a permis d'identifier l'ensemble des souches isolées avec des pourcentages d'homologies de plus de 98 %. Nous avons noté que pour une même souche, différentes propositions sont enregistrées avec des scores identiques.

IV.1. Extraction de l'ADN génomique

Les résultats des concentrations et des rapports d'absorbance sont donnés dans le tableau 35. Nous remarquons que le rapport A260/A280 est compris dans l'intervalle [1,6 – 2,0], ce qui est un indicateur de la pureté des extraits d'ADN obtenus.

Tableau 35 : Résultats des concentrations et des rapports d'absorbance des extraits d'ADN.

N° souche	[c] en ng/µl	A230	A260	A280	A320	A260/A280	A260/A230
437	122	1,27	2,5	1,42	0,055	1,781	2
438	101,5	3,92	2,5	1,71	0,47	1,637	0,588
439	47,5	0,54	1	0,58	0,054	1,792	1,939
440	52	0,6	1,14	0,67	0,104	1,825	2,08
441	230,5	3,74	5,68	3,64	1,07	1,794	1,727
442	80	0,82	1,63	0,88	0,029	1,882	2,025
443	68,5	1,06	1,47	0,84	0,103	1,851	1,427
444	42,5	1,54	1	0,68	0,146	1,604	0,612
445	121,5	1,39	2,49	1,36	0,058	1,869	1,827
447	135	1,32	2,93	1,65	0,227	1,901	2,477
449	272	3,17	5,6	3,12	0,161	1,838	1,807
451	32	0,39	0,6	0,329	0,041	1,73	1,488
452	72,5	2,94	3,47	2,88	2,02	1,686	1,567
453	130	5,86	6,03	4,99	3,43	1,667	1,07
454	19	0,88	1,26	1,12	0,88	1,61	76
455	122	15,04	16,15	15,3	13,71	1,535	1,835
456	267	4,88	6,43	4,24	1,09	1,675	1,409
457	24,5	1,28	0,9	0,76	0,41	1,4	0,563
458	111	9,61	8,56	8,12	6,34	1,247	0,679
459	5,1	0,101	0,094	0,053	-0,007	1,683	0,935

IV.2. Électrophorèse sur gel d'Agarose

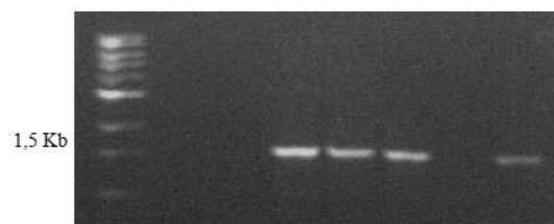
Cette technique nous a permis de séparer les produits d'amplification et de vérifier l'amplification du gène cible (ADNr 16S) via le marqueur de migration, ainsi le produit d'amplification obtenu correspond à une unique bande qui migre à hauteur du marqueur de 1,5 kb ce qui correspond parfaitement au poids moléculaire du gène de l'ARN 16S (<http://www.bacterio.cict.fr/bacdico/genomospecies.html>). La figure 39 suivante représente les profils de migration sur gel d'agarose des isolats identifiés par API 50CHL.



(A) : Souches : 437, 439, 440, 441, 442.



(B) : Souches : 443, 444, 446,452



(C) : Souches : 453, 454, 455, 459

Figure 39 : Profil de migration des souches (de gauche vers la droite).

IV.3. Purification de l'ADN pour le séquençage

Le produit de l'amplification (gène ADNr 16S) a été purifié en utilisant le kit de purification de l'ADN "GENECLEAN® Turbo for PCR". L'évaluation des concentrations de l'ADN après la purification est enregistrée dans le tableau 36.

Tableau 36 : Évaluation des concentrations de l'ADN amplifié après purification.

n° souche	[c] en ng/µl	n° souche	[c] en ng/µl	n° souche	[c] en ng/µl
437	35,5	445	20,5	454	16,6
438	10,3	446	17,5	455	20,5
439	41	447	11,4	456	26,5
440	17,5	448	29,5	457	16,1
441	8,8	449	48	458	12,3
442	58	451	11,9	459	15,9
443	23,5	452	13,6		
444	12,2	453	9,2		

IV.4. Séquençage des gènes

Le séquençage des produits de PCR (gène codant l'ARN 16s) est réalisé par le laboratoire Eurofins MWG. Pour chaque échantillon d'ADN, deux séquences sont ainsi obtenues, l'une correspond au séquençage dans le sens 5' > 3' et l'autre séquence dans le sens 3' > 5'.

L'outil informatique a permis d'obtenir dans un premier temps les séquences complémentaires des brins 3' > 5' en utilisant une application en ligne (http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html), la base de données NCBI «National Center for Biotechnology Information» consultable en ligne est requise pour l'identification des souches.

L'application BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) permet entre autre d'aligner les séquences et de comparer leur pourcentage d'homologie, il donc admis qu'au delà de 97 % d'homologie, deux séquences nucléotidiques appartiennent à une même espèce. L'identification et le pourcentage d'homologie des souches analysées sont donnés dans le tableau 37.

Tableau 37: Identification et pourcentage d'homologie des souches analysées.

<i>n° souche</i>	<i>Identification</i>	<i>Score</i>	<i>Pourcentage</i>
437	<i>Weissella paramesenteroides</i>	2518	99%
	<i>Weissella hellenica</i>	2420	99%
	<i>Leuconostoc paramesenteroides</i>	2420	99%
438	<i>Leuconostoc sp</i>	2220	99%
439	<i>Enterococcus faecalis</i>	2601	99%
	<i>Enterococcus durans</i>	2599	99%
	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	2599	99%
440	<i>Enterococcus faecalis</i>	2599	99%
	<i>Enterococcus durans</i>	2595	99%
	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	2595	99%
441	<i>Enterococcus faecalis</i>	2518	99%
	<i>Enterococcus faecium</i>	2516	99%
	<i>Enterococcus durans</i>	2516	99%
	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	2516	99%
442	<i>Enterococcus faecalis</i>	2586	99%
	<i>Lactococcus lactis subsp. Lactis</i>	2580	99%
	<i>Enterococcus durans</i>	2580	99%
443	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	2189	98%
444	<i>Enterococcus sp</i>	2411	99%
445	<i>Enterococcus faecium</i>	2462	99%
447	<i>Lactobacillus plantarum subsp. Plantarum</i>	2013	99%
449	<i>Enterococcus faecalis</i>	2429	99%
451	<i>Enterococcus faecalis</i>	2514	99%
	<i>Enterococcus faecium</i>	2514	99%
	<i>Enterococcus durans</i>	2514	99%
452	<i>Enterococcus sp</i>	2563	99%
453	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides</i>	2531	99%
454	<i>Enterococcus faecalis</i>	2590	99%
455	<i>Leuconostoc mesenteroides subsp. Mesenteroides</i>	2507	99%
456	<i>Lactococcus lactis</i>	2599	99%
457	<i>Enterococcus durans</i>	2534	99%
458	<i>Enterococcus durans</i>	2527	99%
459	<i>Enterococcus durans</i>	2567	99%

Ces résultats obtenus aboutissent à la construction d'un arbre phylogénique qui schématise les différents liens de parentés au sein d'un phylum, d'une classe ou d'une famille de micro-organismes. L'arbre est construit en utilisant l'application en ligne (<http://phylogeny.lirmm.fr/phylo.cgi/advanced/cgi>). Les résultats obtenus sont résumés sur le dendrogramme présenté en (Figure 40).

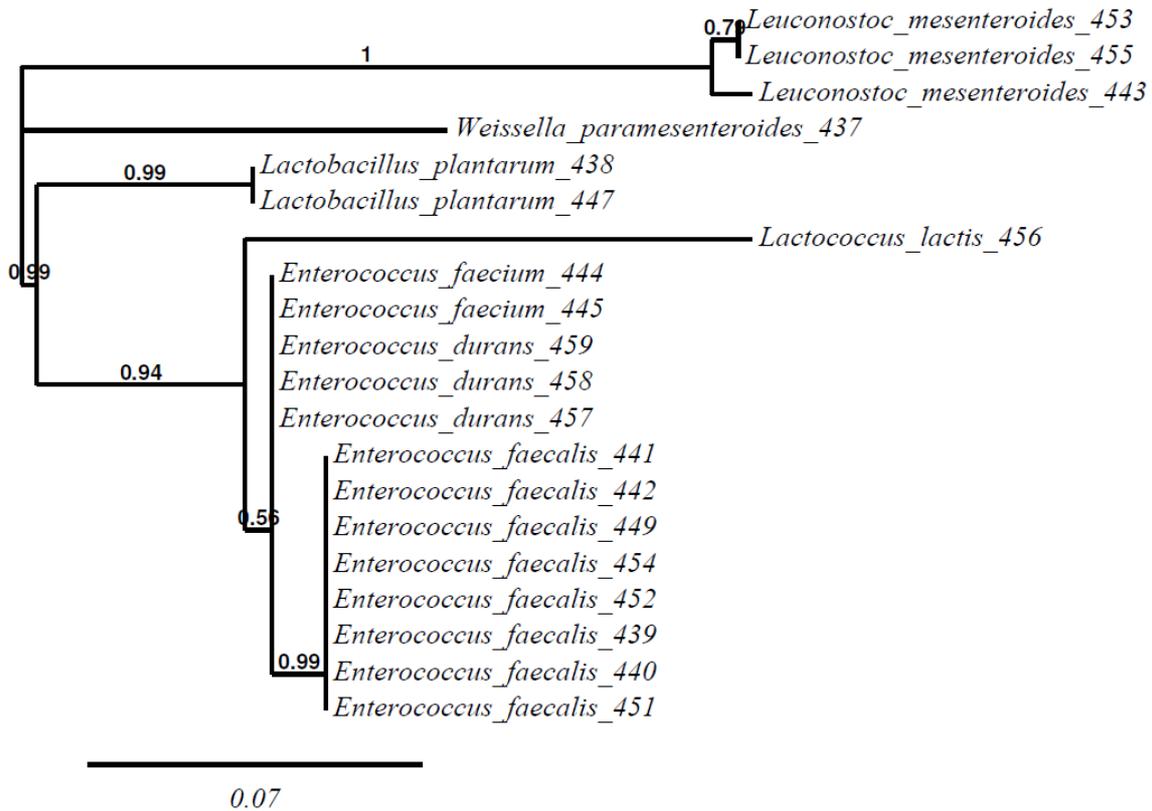


Figure 40 : Dendrogramme de bactéries lactiques.

V. Activité antibactérienne des bactéries lactiques

C'est grâce aux métabolites synthétisés à action bactéricide ou bactériostatique tels que l'éthanol, le peroxyde d'hydrogène, le diacétyle (Atrih et Foster, 2001), les composés antifongiques (Corsetti *et al.*, 1998), les acides phényllactiques (Lavermicocca *et al.*, 2000), les antibiotiques comme la reutéricycline (Höltzel *et al.*, 2000) et les bactériocines, que les bactéries lactiques sont reconnues comme de bons agents de conservation des produits alimentaires (Abee *et al.*, 1995, Klaenhammer, 1988).

Les microorganismes pathogènes testés dans notre étude sont impliqués dans les toxi-infections ou les intoxications alimentaires appartiennent aux espèces suivantes : *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Micrococcus luteus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, et *Escherichia coli*.

Les résultats des interactions ont montré que les souches isolées possèdent un effet inhibiteur contre les 6 souches pathogènes utilisées dont la souche 445 est la plus active, suivie par les souches 438 et 447 (Tableau 38, Figure 41). Pour les autres souches, le diamètre des zones d'inhibition varie entre 0 et 37 mm avec une activité remarquable des souches 454, 445, 440 et 459, respectivement contre *P. aeruginosa*.

Ces résultats coïncident avec les travaux de **Savado** *et al.* (2004) pour certaines souches, où les diamètres des zones d'inhibition des bactéries lactiques isolées du lait fermenté sont de l'ordre de 9 à 10 mm vis-à-vis de *S. aureus* et de 8 à 9 mm vis-à-vis d'*E. coli*. Par contre, les souches de *Leuconostoc* isolées par **Tadesse et al. (2007) à partir de Borde et de Shamita d'Ethiopie (produits fermentés traditionnels) sont plus actives sur *E. coli* (15 mm) mais elles ont montré des diamètres des zones d'inhibition similaires avec nos résultats sur *S. aureus* (16 mm).**

Les potentialités inhibitrices naturelles par des tests d'interaction entre les bactéries pathogènes et les isolats de bactéries lactiques nous ont permis de remarquer que le diamètre des zones d'inhibition varie selon l'espèce (**Prioult, 2003**).

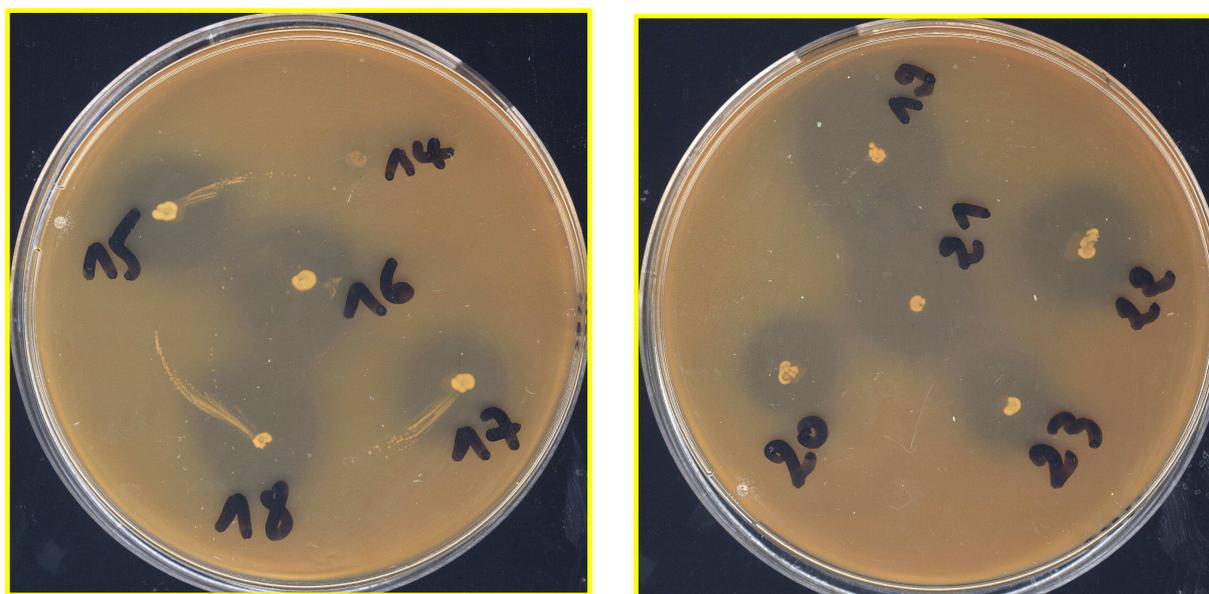


Figure 41 : Photos de l'activité antibactérienne des souches isolées de bactéries lactiques sur *Escherichia coli* ATCC 8739.

Tableau 38. Activité antimicrobienne des bactéries lactiques isolées des produits laitiers traditionnels (en mm).

Souche	Origine	Souche- test					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
437	Dhan (E ₃)	08 ^a	08	06	10	14	15
438	Dhan (E ₃)	20	15	11	13	23	30
439	Dhan (E ₂)	04	06	07	00	16	12
440	Dhan (E ₂)	10	07,5	07	06,5	15	34
441	Dhan (E ₂)	08,5	11	05	06	11	09
442	Dhan (E ₂)	03	09	04	03	05	03
443	Zebda (E ₁)	08	15	14	10	24	07
444	Zebda (E ₁)	10	21	11	17	16	15
445	Zebda (E ₁)	35	14	16,5	34	20	36
447	Zebda (E ₁)	17	14	13	08	11,5	23
449	Zebda (E ₈)	10	12	06	18	07,5	13,5
451	Klila (E ₆)	09	08	10	19	05	22,5
452	Klila (E ₆)	09	04,5	00	00	19	00
453	Klila (E ₆)	09,5	09	05,5	13	09	24
454	Jben (E ₇)	09,5	14	08,5	09	09	36,7
555	Jben (E ₇)	08	24	00	04	05,5	00
456	Jben (S ₇)	10,5	08,5	08	05	01	16
457	Jben (S ₇)	08,5	15	09	09	09	26
458	Jben (S ₇)	07	21	07	07	05	20,5
459	Jben (S ₇)	07	10	08	05	03,5	32

^a Les valeurs correspondantes à des moyennes de plusieurs essais.

Les bactéries lactiques présentées dans cette étude ne sont pas productrices de bactériocine et elles peuvent entrer donc dans la catégories des ingrédients (**Wessels *et al.*, 2004**). Du point de vue du consommateur, elles se rapprochent alors d'avantage des probiotiques et bénéficient ainsi de l'image positive qui leur est associée, spécialement si elles permettent d'éviter l'utilisation de conservateurs chimiques. Les mécanismes d'inhibition par lesquels ces souches parviennent à inhiber les bactéries d'altération et pathogènes devront cependant être élucidés (**Matamoros, 2008**).

Conclusion générale

La résistance microbienne aux molécules constitue un problème important lorsqu'elle concerne des microorganismes pathogènes. Cette résistance se traduit par la capacité acquise d'un microorganisme à résister aux effets d'un agent chimiothérapeute pour lequel il est normalement sensible; la propagation de ses bactéries est devenue une préoccupation sanitaire majeure.

La recherche de nouvelles substances antimicrobiennes dont le spectre d'activité serait plus large tout en étant moins agressive pour l'hôte semble toujours indispensable.

Les actinomycètes sont d'importants producteurs d'antibiotiques (75% par *Streptomyces*) et autres métabolites secondaires. Les deux tiers des quelque six mille antibiotiques isolés sont produits par les actinomycètes.

L'objectif de ce travail a été le criblage de souches d'actinomycètes et de bactéries lactiques à activité antibactérienne et antifongique à partir d'une collection de souches. Nous avons procédé à l'isolement, l'identification et l'évaluation de l'activité biologique des souches sur des microorganismes pathogènes par deux méthodes de diffusion sur agar.

Les résultats des tests morphologiques, physiologiques, biochimiques et génotypiques, des bactéries étudiées montrent que les actinomycètes isolées des sols appartiennent au genre *Streptomyces*. Alors que celles provenant des produits laitiers traditionnels sont d'une très grande variété d'espèces, cette diversité dépend de leurs lieux d'isolement.

Les 20 isolats de bactéries lactiques provenant de produits laitiers traditionnels ont présenté une grande diversité d'espèce : *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactococcus lactis*, *Weissella paramesenteroides*, *Lactobacillus plantarum*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans* et *Enterococcus faecalis*.

Les essais de la recherche par PCR des systèmes génétiques de biosynthèse des peptides lasso n'ont pas réussi à l'amplification des régions *svicC* et *svicB* de l'ADN des bactéries actinomycètes du genre *Streptomyces*. De même d'après les tests d'extraction et de purification des bactériocines, les souches lactiques isolées des produits laitiers traditionnels ne sont pas productrices de peptides antimicrobiens.

Au terme de ce travail, nous envisageons de continuer nos recherches sur certains axes pertinents relatifs aux microorganismes et qui méritent d'être étudiés:

✓ Isolement et sélection des souches bactériennes à partir des écosystèmes originaux (grottes, sebkha, milieux extrêmes...) selon leur profil d'activité antimicrobienne. Les bactéries productrices de peptides antimicrobiens seront alors spécifiquement sélectionnées par rapport à celles produisant des petits métabolites, puis ces peptides seront isolés et caractérisés structurellement.

✓ Essais de l'activité antimicrobienne des peptides isolés sur des souches prélevées au sein du même écosystème, de manière à analyser les compétitions microbiennes au sein des écosystèmes d'Algérie sélectionnés.

✓ Les compétences acquises dans ce domaine peuvent être utilisées pour étudier la biodiversité des bactéries lactiques de d'autres produits laitiers traditionnels et leurs métabolites secondaires à activité biologique.

✓ Recherche de souches probiotiques à partir des produits laitiers traditionnels et criblage de souches productrices de bactériocines.

Références bibliographiques

A

- Abdelaziz, W. (2006). Isolement des mycètes producteurs de substances antibactériennes à partir des sols sahariens. Mémoire de Magister, option Microbiologie et Biochimie Appliquées. Université Mentouri de Constantine, Département des Sciences de la nature et de la Vie. 100 p.
- Abee, T., Krockel, L., Hill, C. (1995). Bacteriocins: modes of action and potentials in food preservation and control of food poisoning. *Int J Food Microbiol*, 28:169–185.
- Ahmed, A. (1968). Mechanism of inhibition of protein synthesis by spiramycin. *Biochim Biophys Acta*, 166(1): 205–17.
- Alain, K., Zbinden, M., Le Bris, N., Lesongeur, F., Quérellou, J., Gaill, F., Cambon-Bonavita, M.A. (2004). Early steps in microbial colonization processes at deep-sea hydrothermal vents. *Env Microbiol*, 6: 227–241.
- Allan, E. J., Prosser, J.I. (1983). Mycelial growth and branching of *Streptomyces coelicolor*. A3(2) on solid medium. *J Gen Microbiol*, 129(7): 2029–2036.
- Allgaier, H., Jung, G., Werner, R.G., Schneider, U., Zahner, H. (1986). Epidermin: sequencing of a heterodetic tetracyclic 21-peptide amide antibiotic. *Eur J Biochem*, 160: 9–22.
- Al-Zarban, S.S., Al-Musallam, A.A., Abbas, I., Stackebrandt, E., Kioppenstedt, R.M. (2002). *Saccharomonospora halophila* sp. nov., a novel halophilic actinomycete isolated from marsh soil in Kuwait. *Int J Sys Env Microbiol*, 52: 555-558.
- Amann, R.I., Ludwig, W., Schleifer, K.-H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiol Rev*, 59(1): 143–169.
- Amanullah, A., Justen, P., Davies, A., Paul, G.C, Nienow, A.W., Thomas C.R. (2000). Agitation induced mycelial fragmentation of *Aspergillus oryzae* and *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Eng J*, 5 (2): 109–114.
- Ammor, S., Tauveron, G., Dufor, E., Chevalier, I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1-Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*, 17: 454–461.
- Atrih, A., Foster, S. J. (2001). Analysis of the role of bacterial endospore cortex structure in resistance properties and demonstration of its conservation amongst species. *J Appl Microbiol*, 91: 364–372.
- Axelsson, L. (2004). Classification and physiology In: Lactic acid bacteria: Microbiological and functional aspects. Salsinen S., Wright A.V., Ouwehand A. 3e Ed. New York, Marcel Dekker, Inc. 633: 1 - 66.
- Axelsson, L., Holck, A. (1995). The genes involved in production of and immunity to sakacin A, a bacteriocin from *Lactobacillus sake* Lb706. *J Bacteriol*, 177: 2125–2137.

B

- Baize, D. (2000). Guide des analyses en pédologie : choix, expression, présentation, interpretation. 2^{ème} Editions Quae, INRA. 257 p.
- Balagurunathan, R., Xu, L., Jiang, C. (1996). Diversity of soil actinomycetes from south India and south China. *Actinomycetes*, 4(3) : 89–94.
- Baldacci, E. (1962). Tendances actuelles de la classification des actinomycètes. *Ann Soc Belge Méd Trop*, 4 : 633–646.
- Baliarda A. (2003). Évaluation de la réponse au stress chez les bactéries lactiques appartenant aux genres *Pediococcus* et *Tetragenococcus* approches physiologiques et génétiques. Thèse de Doctorat. Spécialité : Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1. 394 p.
- Basilio, A., González, I., Vicente, M.F., Gorrochategui, J., Gabello, 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.
- 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 nonpolyéniques. *MIRCEN J Appl Microbiol Biotechnol*, 2: 453–466.
- Bastos, M.C., Ceotto, H., Coelho, M.L., Nascimento, J.S. (2009) Staphylococcal antimicrobial peptides: relevant properties and potential biotechnological applications. *Curr Pharm Biotechnol*, 10: 38–61.
- Bayro, M., Mukhopadhyay, J., Swapna, G., Huang, J., Ma, L.-C., Sineva, E., Dawson, P., Montelione, G., Ebright, R. (2003). Structure of antibacterial peptide microcin J25: a 21- residue lariat protoknot. *J Am Chem Soc*, 125: 12382–12383.
- Becker, B., Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. (1965). Chemical composition of cell-wall preparations from strains of various form-genera of aerobic actinomycetes. *Appl Microbiol*, 13: 236–43.
- Bendimerad, N. (2013). Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben». Thèse de Doctorat en Microbiologie alimentaire. Université de Tlemcen, Département de Biologie. 162p.
- Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Volume 5, Whitman W.B., Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H.-J., Trujillo M.E., Ludwig W., and Suzuki K.I., (Eds.) (2012) Springer, 2nd Edition.
- Bierbaum, G., Sahl, H. G. (2009). Lantibiotics: mode of action, biosynthesis and bioengineering. *Curr Pharm Biotechnol*, 10: 2–18.
- Birri, D. J., Brede, D. A., Forberg, T., Holo, H., Nes, I. F. (2010). Molecular and genetic characterization of a novel bacteriocin locus in *Enterococcus avium* isolates from infants. *Appl Environ Microbiol*, 76: 483–492.
- Björkroth, J., Holzappel, W. (2006). Genera *Leuconostoc*, *Oenococcus* and *Weissella*. In: Dworkin, M., Falkow, S., Rosenberg, E., Schleifer, K.-H., Stackebrandt, E. (Eds). The Prokaryotes: An Evolving Electronic Resource for the Microbiological Community (3rd edition). Springer Verlag. New York, USA. pp 267–319.

- Blond, A., Cheminant, M., Ségalas-Milazzo, I., Péduzzi, J., Barthélémy, M., Goulard, C., Salomón, R., Moreno, F., Farías, R., Rebuffat, S. (2001). Solution structure of microcin J25, the single macrocyclic antimicrobial peptide from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 268: 2124–2133.
- Blond, A., Péduzzi, J., Goulard, C., Chiuchiolo, M., Barthélémy, M., Prigent, Y., Salomón, R., Farías, R., Moreno, F., Rebuffat, S. (1999). The cyclic structure of microcin J25, a 21-residue peptide antibiotic from *Escherichia coli*. *Eur J Biochem*, 259: 747–756.
- Boeck, L.D., Mertz, F.P. (1986). A47934, a novel glycopeptide-aglycone antibiotic produced by a strain of *Streptomyces toyocaensis* taxonomy and fermentation studies. *J Antibiot (Tokyo)*, 39(11): 1533–40.
- Boiron, P., Provost, F., Dupont, B. (1993). Méthodes de laboratoire pour le diagnostic de la nocardiose. Institut Pasteur, Collection "Commission des laboratoires de référence et d'expertise de l'Institut Pasteur", Paris. 180 p.
- Boman, H. G. (1998). Gene-Encoded Peptide Antibiotics and the Concept of Innate Immunity: An Update Review. *Scand J Immunol*, 48(1):15–25.
- Borelli, D., Middelveen, M. (1986). Actinomycetoma caused by *Streptomyces somaliensis*. *Arch Dermatol*, 122: 1097–1098.
- Boudemagh, A. (2007). Isolement, à partir des sols Sahariens, de bactéries actinomycétales productrices de molécules antifongiques, identification moléculaire de souches actives. Thèse de Doctorat en Microbiologie Appliquée. Université Mentouri Constantine. Algérie. 132 p.
- Boudjelal, F., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Nasserline Sabaou, N. (2011). Taxonomic study and partial characterization of antimicrobial compounds from a moderately halophilic strain of the genus *Actinoalloteichus*. *Braz J Microbiol*, 42(3): 835–845.
- Boudjella, H., Bouti, K., Zitouni, A., Mathieu, F., Lebrihi, A., Sabaou, N. (2007). Isolation and partial characterization of pigment-like antibiotics produced by a new strain of *Streptosporangium* isolated from an Algerian soil. *J Appl Microbiol*, 103(1): 228–36.
- Boudjella, H., Boutia, K., Zitounia, A., Mathieub, F., Lebrihib, A., Sabaoua N. (2006). Taxonomy and chemical characterization of antibiotics of *Streptosporangium* Sg 10 isolated from a Saharan soil. *Microbiol Res*, 161(4) : 288–298.
- Boughachiche, F., Reghioua, S., Oulmi, L., Zerizer, H., Kitouni, M., Boudemagh, A., Boulahrouf, A. (2005). Isolement d'actinomycétales productrices de substances antimicrobiennes à partir de la Sebkha de Ain Mlila. *Sciences & Technologie C*, 23 : 5–10.
- Bourgeois, C. M., Larpent, J.P. (1996). Aliments fermentés et fermentation alimentaire, Microbiologie alimentaires. Tome 2. Edition © Technique Documentation Lavoisier, Paris.
- Brisabois, A., Lafarge, V., Brouillaud, A., De Buyser, M.L., Collette, C., Garin-Bastuji, B., Thorel, M.F., (1997). Pathogenic micro-organisms in milk and dairy products: the situation in France and in Europe. *Rev Sci Tech*, 16: 452–471.
- Brotz, H., Bierbaum, G., Markus, A., Molitor, E., Sahl, H.G. (1995). Mode of action of the lantibiotic mersacidin: inhibition of peptidoglycan biosynthesis via a novel mechanism?. *Antimicrob Agents Chemother*, 39 (3): 714–719.

C

- Cadet, D.E., Fontenay G., Laveille B., Linas M. D., Segula, J. P. (1996). Comparaison statistique de deux méthodes d'évaluation de l'activité antifongique. *J Mycol Méd*, 6 (3) : 129–132.
- Carelotti, A., Boiron, P., Provost, P., Villard, J. (1994). *Nocardia* et bactéries apparentées. In : Manuel de Bactériologie clinique. Eds : Freney, J., Renauld, F., Hansen, W., and Bollet C. 2^{ème} Éd. 2: 811–831.
- Chao, S.H., Huang, H.Y., Kang, Y.H., Watanabe, K., Tsai, Y.C. (2013). The diversity of lactic acid bacteria in a traditional Taiwanese millet alcoholic beverage during fermentation. *LWT - Food Sci Technol*, 51(1): 135–142.
- Chater, K. (1999). David Hopwood and the emergence of *Streptomyces* genetics. *Int Microbiol*, 2(2): 61–68.
- Chatterjee, S., Chatterjee, D.K., Jani, R.H., Blumbach, J., Ganguli, B.N., Klesel, N., Limbert, M., Seibert, G. (1992). Mersacidin, a new antibiotic from *Bacillus*. In vitro and in vivo antibacterial activity. *J Antibiot (Tokyo)*, 45(6): 839–845.
- Chelli, R. (2010). Etude de la diversité des bactéries actinomycétales dans les sols fertiles d'El-baaraouia de la région de Constantine. Mise en évidence de l'activité antibiotique des isolats d'actinomycètes autres que *Streptomyces*. Thèse de Magistère en Biologie. Université Mentouri Constantine. Algérie. 93 p.
- Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A.M.A., El Soda, M., Bensoltane, A. (2007). Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *Afr J Biotech*, 6(15): 1854–1861.
- Chiba, H., Agematu, H., Kaneto, R., Terasawa, T., Sakai, K., Dobachi, K., Yoshioka, T. (1999). Rhodopeptins (Mer-N1033), novel cyclic tetrapeptides with antifungal activity from *Rhodococcus sp.*: I. taxonomy, fermentation, isolation, physico-chemical properties and biological activities. *J Antibiotics*, 52(8):695–699.
- Chikindas, M.L., Novak, J., Driessen, A.J., Konings, W.N., Schilling, K. M., Caufield, P.W. (1995a). Mutacin II, a bactericidal antibiotic from *Streptococcus mutans*. *Antimicrob Agents and Chemother*, 39(12): 2656–60.
- Chun, J., Seang, C.N., Lee, K. J., Kang, S.A., Goodfellow, M., Hah V.C. (1998). *Nocardia flavorosea* sp. Nov. *Inter J Syst Bacteriol*, 48(Pt 3): 901–905.
- Cintas, L. M., Casaus, P., Holo, H., Hernandez, P. E., Nes, I. F., Havarstein, L. S. (1998). Enterocins L50A and L50B, two novel bacteriocins from *Enterococcus faecium* L50, are related to staphylococcal hemolysins. *J Bacteriol*, 180(8): 1988–1994.
- Collins, M.D., Pirouz, T., Goodfellow, M., Minnikin, D.E. (1977). Distribution of enaquinones in actinomycetes and corynebacteria. *J Gen Microbiol*, 100(2): 221–230.
- Colwell, R.R. (1970). Polyphasic taxonomy of the genus *Vibrio*: numerical taxonomy of *Vibrio cholerae*, *Vibrio parahaemolyticus*, and related *Vibrio* species. *J Bacteriol*, 104(1): 410–433.
- Comité de l'Antibiogramme de la Société Française de Microbiologie (CASFM) (2012). 59 p. www.sfm-microbiologie.org/.../CASFM_2012.pdf.
- Corsetti, A., Gobbetti, M., Rossi, J., Damiani, P. (1998). Antimould activity of sourdough lactic acid bacteria: identification of a mixture of organic acids produced by *Lactobacillus sanfrancisco* CB1. *Appl Microbiol Biotechnol*, 50(2): 253–256.

- Cotter, P. D., Hill, C., Ross, R. P. (2005). Bacteriocins: developing innate immunity for food. *Nat Rev Microbiol*, 3(10): 777–788.
- Crawford, D. L., Lynch, J. M., Ousley, M.A. (1993). Isolation and characterisation of actinomycetes antagonists of a fungal root pathogen. *Appl Environ Microbiol*, 59(11): 3899-3905.
- Cross, T. (1982). Actinomycetes: a continuing source of new metabolites. *Dev Ind Microbiol*, 23: 1–18.

D

- Davies, F. L., Williams, S.T. (1970). Studies on the ecology of actinomycetes in soil: I. The occurrence and distribution of actinomycetes in a pine forest soil. *Soil Biol Biochem*, 2(4): 239–246.
- Daw, M.A., Falkner, F.R. (1996). Bacteriocins: nature, function and structure. *Micron*, 27(6): 467–479.
- de Ambrosini, V. M., Gonzalez, S., Perdigon, G., de Ruiz Holgado, A. P., Oliver, G. (1996). Chemical composition of the cell wall of lactic acid bacteria and related species. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 44(12) : 2263–2267.
- De Man, J.C., Rogosa, M., Elisabeth Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of Lactobacilli. *J Appl Bacteriol*, 23(1) : 130–135.
- Delarras C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire : Aliments, produits cosmétiques, eaux, produits pharmaceutiques. Éditions Médicales Internationales, Lavoisier 476 p.
- Dellaglio, F., de Roissart, H., Torriani, S., Curk, M.C., Janssens, D. (1994). Caractéristiques générales des bactéries lactiques. In Bactéries Lactiques, pp. 25–116. Edited by H. de Roissart & F. M. Luquet. Paris : Lavoisier.
- Delves-Broughton, J., Blackburn, P., Evans, R.J., Hugenholtz, J. (1996). Applications of the bacteriocin, nisin. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 69(2): 193–202.
- Demain, A.L. (2000). Small bugs, big business: the economic power of the microbe. *Biotechnol Adv*, 18(6): 499-514.
- Demain, A.L., Solomon N.A. (1985). Biology of industrial microorganisms. The Benjamin/Cummings publishing company, Inc. pp 291–357.
- Dhanasekaran, D., Rajakumar, G., Sivamani, P., Selvamani, S., Panneerselvam, A., Thajuddin, N. (2005). Screening of salt pans actinomycetes for antibacterial agents. *The Internet J Microbiol*, 1(2): 6–12.
- Diep, D. B., Håvarstein, L. S., Nes, I. F. (1996). Characterization of the locus responsible for the bacteriocin production in *Lactobacillus plantarum* C11. *J Bacteriol*, 178(15): 4472–4483.
- Diep, D.B., Nes, I.F. (2002). Ribosomally synthesized antibacterial peptides in Gram positive bacteria. *Curr Drug Targets*, 3(2): 107–122.
- Dietz, A., Mathews J. (1971). Classification of *Streptomyces* spore surfaces into five groups. *Appl Microbiol*, 21(3): 527–33.

- Dirix, G., Monsieurs, P., Dombrecht, B., Daniels, R., Marchal, K., Vanderleyden, J., Michiels, J. (2004). Peptide signal molecules and bacteriocins in Gram-negative bacteria: a genome-wide in silico screening for peptides containing a double-glycine leader sequence and their cognate transporters. *Peptides*, 25(9): 1425–1440.
- Djaballah, C. (2010). Biodiversité des actinomycètes halophiles et halotolérants isolés de la sebkha de Ain M'lila. Mémoire de Magister en Microbiologie. Université Mentouri Constantine. 73 p.
- Djazaïrouna l'Atlas pratique de l'Algérie (2004) 1^{er} Edition de l'Institut national de cartographie et de télédétection (I.N.C.T). 200p.
- Donadio, S., Sosio, M., Lancini, G. (2002). Impact of the first *Streptomyces* genome sequence on the discovery and production of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol*, 60(4) : 377–80.
- Dortu, C. (2008). Isolement d'une bactérie lactique produisant de la sakacin G et utilisation sur des matrices alimentaires. Thèse de doctorat en Sciences Agronomiques et Ingénierie Biologique. Université de Gembloux, Belgique. 131 p.
- Drider, D., Fimland, G., Hechard, Y., McMullen, L. M., Prevost, H. (2006). The continuing story of class IIa bacteriocins. *Microbiol Mol Biol Rev*, 70(2): 564–582.
- Ducasse, R. (2012). Etude structurale et fonctionnelle de peptides lasso à l'aide de méthodes spectroscopiques. Thèse de Doctorat de l'université Pierre et Marie Curie, spécialité : Biochimie. 190 p.
- Ducasse, R., Yan, K.-P., Goulard, C., Blond, A., Li, Y., Lescop, E., Guittet, E., Rebuffat, S., Zirah, S. (2012). Sequence determinants governing the topology and biological activity of a lasso peptide, microcin J25. *Chembiochem*, 13(3): 371–380.
- Dulaney, E.L., Larsen, A.H., Stapley, E.O. (1955). A note on the isolation of microorganisms from natural sources. *Mycologia*, 47(3) : 420–422.
- Duquesne, S. (2007). Peptides antimicrobiens des entérobactéries. Etude de la voie de maturation et du mécanisme d'import de la microcine J25, peptide antimicrobien inhibiteur de l'ARN polymérase. Thèse de Doctorat en Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 190 p.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J., Rebuffat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Nat Prod Rep*, 24(4): 708–734.
- Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Zirah, S., Goulard, C., Peduzzi, J., Rebuffat, S. (2007). Two enzymes catalyze the maturation of a lasso peptide in *Escherichia coli*. *Chem Biol*, 14(7): 793–803.
- Duraipandiyani, V., Sasi, A.H., Islam, V.I.H., Valanarasu, M., Ignacimuthu, S. (2010). Antimicrobial properties of actinomycetes from the soil of Himalaya. *J Med Mycol*, 20(1): 15–20.
- Durlu-özkaya, F., Aslim, B., Taha Özkaya, M. (2007). Effect of exopolysaccharides (EPSs) produced by *Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus* strains to bacteriophage and nisin sensitivity of the bacteria. *LWT - Food Sci Technol*, 40(3): 564–568.
- Duthoit F., Godon J.J., Montel M.C. (2003). Bacterial community dynamics during production of registered designation of origin Salers cheese as evaluated by 16S rRNA gene single-strand conformation polymorphism analysis. *Appl Environ Microbiol*, 69(7): 3840–3848.

E

- El Khoury, A. (2007). Champignons Mycotoxinogènes et Ochratoxine A (OTA) et Aflatoxine B1 (AFB1) dans les vignobles libanais : Occurrence et Origine. Thèse de Doctorat en Génie des procédés et de l'environnement. Institut National Polytechnique de Toulouse. France. 200 p.
- Ensign, J.C., Normand, P., Burden, J.P., Yallop, C.A. (1993). Physiology of some actinomycete genera. *Res Microbiol*, 144(8): 657–660.
- Epand, R.M., Vogel, H.J. (1999) Diversity of antimicrobial peptides and their mechanisms of action. *Biochim Biophys Acta*, 1462(1-2):11–28.

F

- Falagas, M. E., Betsi, G. I., Athanasiou, S. (2006). Probiotics for prevention of recurrent vulvovaginal candidiasis: a review. *J Antimicrob Chemother*, 58(2): 266–272.
- Farris, M.H., Olson, J.B. (2007). Detection of Actinobacteria cultivated from environmental samples reveals bias in universal primers. *Lett Appl Microbiol*, 45(4): 376–381.
- Feng, G., Guron, G. K., Churey, J. J., Worobo, R. W. (2009). Characterization of mundticin L, a class IIa anti-Listeria bacteriocin from *Enterococcus mundtii* CUGF08. *Appl Environ Microbiol*, 75(17): 5708–5713.
- Flärdh, K. (2003). Growth polarity and cell division in *Streptomyces*. *Curr Opin Microbiol*, 6(6): 564–71.
- Fleming, H.P., Etchells, J.L., Costilow, R.N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl Microbiol*, 30(6): 1040–1042.
- Fleury, Y., Dayem, M. A., Montagne, J. J., Chaboisseau, E., Le Caer, J. P., Nicolas, P., Delfour, A. (1996). Covalent structure, synthesis, and structure-function studies of mesentericin Y 105(37), a defensive peptide from gram-positive bacteria *Leuconostoc mesenteroides*. *J Biol Chem*, 271(24): 14421–14429.
- Fourati-Ben Fguira, L., Fotso, S., Ben Ameer-Mehdi, R., Mellouli, L., Laatsch, H. (2005). Purification and structure elucidation of antifungal and antibacterial activities of newly isolated *Streptomyces* sp. strain US80. *Res Microbiol*, 156(3): 341–347.
- Franz, C. M., van Belkum, M. J., Holzapfel, W. H., Abriouel, H., Gálvez, A. (2007). Diversity of enterococcal bacteriocins and their grouping in a new classification scheme. *FEMS Microbiol Rev*, 31(3): 293–310.
- Fréchet, D., Guitton, J., Herman, F., Faucher, D., Helynck, G., Monegier du Sorbier, B., Ridoux, J.P., James-Surcouf, E., Vuilhorgne, M. (1994). Solution structure of RP 71955, a new 21 amino acid tricyclic peptide active against HIV-1 virus. *Biochemistry*, 33(1): 42–50.
- Fredenhagen, A., Fendrich, G., Marki, F., Marki, W., Gruner, J., Raschdorf, F., Peter, H.H. (1990). Duramycins B and C, two new lanthionine containing antibiotics as inhibitors of phospholipase A2. Structural revision of duramycin and cinnamycin. *J Antibiot (Tokyo)*, 43(11): 1403–1412.

- Fregeau Gallagher, N. L., Sailer, M., Niemczura, W. P., Nakashima, T. T., Stiles, M. E., Vederas, J. C. (1997). Three-dimensional structure of leucocin A in trifluoroethanol and dodecylphosphocholine micelles: spatial location of residues critical for biological activity in type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 36(49):15062–15072.
- Fukamizo, T., Brzezinski, R. (1997). Chitosanase from *Streptomyces* sp. strain N174: a comparative review of its structure and function. *Biochem Cell Biol*, 75(6):687–696.

G

- Gálvez, A., Abriouel, H., Lopez, R. L., Ben Omar, N. (2007). Bacteriocin-based strategies for food biopreservation. *Int J Food Microbiol*, 120(1-2): 51–70.
- Ganz, T., Lehrer, R. I. (1998). Antimicrobial peptides of vertebrates. *Curr Opin Immunol*, 10(1): 41–44.
- Gaoui, H., Souida, K. (2009). Etude du pouvoir antimicrobien des bactéries lactiques isolées des produits laitiers traditionnels du Sud Algérien. Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Génie Biologique. Université de Laghouat. Algérie. 51 p.
- Garcia-Olmedo, F., Molina, A., Alamillo, J. M., Rodriguez-Palenzuela, P. (1998). Plant defense peptides. *Biopolymers*, 47(6):479–91.
- Garrity, G.M., Bell, J.A., Lilburn, T.G. (2004). Taxonomic Outline of the Prokaryotes, Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Second Edition Release 5.0, Springer-Verlag, New York. 1-399. [http:// dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline_200310](http://dx.doi.org/10.1007/bergeysoutline_200310).
- Gasperini, G., (1892). Ann. Igiene Sper. Roma, 1 (n.s.), 339–428.
- Gasperini, G., (1894). Centralbl. f. Bakt. Parasitenk. II. Abt. 15, 684.
- Gazenko, S.V., Reponen, T.A., Grinshpun, S.A., Willeke, K. (1998). Analysis of airborne actinomycete spores with fluorogenic substrates. *Appl Environ Microbiol*, 64(11): 4410–4415.
- Georghiou, P.R., Blacklock, Z.M. (1992). Infection with *Nocardia* species in Queensland. A review of 102 clinical isolates. *Med J Aust*, 156(10): 692–697.
- Geraldine, M., Schofield, M., Schaal, K. P. (1981). A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbiol*, 127(2): 237–259.
- Ghanem, N.B., Sabry, S.A., El-Sherif, Z.M., Abu El-Elal, G.A. (2000). Isolation and enumeration of marine actinomycetes from seawater and sediments in Alexandria. *J Gen Appl Microbiol*, 46(3): 105–111.
- Gilarová, R., Voldrich, M., Demnerová, K., Cerovský, M., Dobiáš, J. (1994). Cellular fatty acids analysis in the identification of lactic acid bacteria. *Int J Food Microbiol*, 24(1-2): 315–319.
- Girard, H., Rougieux, R. (1967). Techniques de microbiologie agricole. Dunod, Paris. 216p.
- Girum, T., Eden E., et Mogessie A. (2007). Assessment of the antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Borde and Shamita, traditional Ethiopian fermented beverages, on some foodborne pathogens and effect of growth medium on the inhibitory activity. *Internet Journal of Food Safety*, V(5): 13-20.
- Gonzalez-Toril, E., Llobet-Brossa, E., Casamayor, E.O., Amann, R., Amils, R. (2003). Microbial ecology of an extrême acidic environment, the Tinto River. *Appl Environ Microbiol*, 69(8): 4853–4865.

- Goodfellow M., Simpson K. E., (1987). Ecology of streptomycetes. *Front Appl Microbiol*, 2: 97–125.
- Goodfellow, M., Williams, S.T. (1983). Ecology of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 37: 189–216.
- Gottlieb, D. (1973). General consideration and implication of the *Actinomycetales*. In: *Actinomycetales* characteristics and practical importance. Edited by G. Sykes and F.A. Skinner. Academic Press, London, New York.
- Gray, E.J., Lee, K.D., Souleimanov, A.M., Di Falco, M.R., Zhou, X., Ly, A., Charles, T.C., Driscoll, B.T., Smith, D.L. (2006). A novel bacteriocin, thuricin 17, produced by plant growth promoting rhizobacteria strain *Bacillus thuringiensis* NEB17: isolation and classification. *J Appl Microbiol*, 100(3): 545–554.
- Grigorova, R., Norris, J.R. (Editors) (1990). Techniques in microbial ecology. Methods in Microbiology, Vol. 22. Academic Press, London, pp. 627.
- Gross, E., Kiltz, H.H. (1973). The number and nature of, -unsaturated amino acids in subtilin. *Biochem Biophys Res Commun*, 50(2): 559–565.
- Guder, A., Wiedemann, I., Sahl, H.G. (2000). Posttranslationally modified bacteriocins--the lantibiotics. *Biopolymers*, 55(1): 62–73.

H

- Hacène, H., Sabaou, N., Bounaga, N., Lefevre, G. (1994). Screening for non-polyenic antifungal antibiotics produced by rare actinomycetales. *Microbios*, 79(319): 81–5.
- Hammami, R. (2009) Approches biochimiques et bioinformatiques pour l'étude de la relation structure/fonction des peptides antimicrobiens d'origine végétale. Thèse de Doctorat des Universités de Tunis El Manar et de Lille I, Spécialité ; Biologie. 107 p.
- Hancock, R.E., Chapple, D.S. (1999). Peptide antibiotics. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(6): 1317–1323.
- Hastings, J. W., Sailer, M., Johnson, K., Roy, K. L., Vederas, J. C., Stiles, M. E. (1991). Characterization of leucocin A-UAL 187 and cloning of the bacteriocin gene from *Leuconostoc gelidum*. *J Bacteriol*, 173(23): 7491–7500.
- Hayakawa, M., Nonomura H. (1987). Humic acid – vitamins agar, a new medium for the selective isolation of soil actinomycetes. *J Ferment Technol*, 65(5): 501–509.
- Hazen, E. L., Brown, R. (1951). Fungicidin, an antibiotic produced by soil actino mycete. *Proc Soc Exp Bio Med*, 76(1) : 93–97.
- Helynck, G. (1994). Nouveaux polypeptides biologiquement actifs, préparation et utilisation. *Brevet*, WO1994001462 A1.
- Helynck, G., Dubertret, C., Mayaux, J.-F., Leboul, J. (1993). Isolation of RP 71955, a new anti-HIV-1 peptide secondary metabolite. *J Antibiot(Tokyo)*, 46(11): 1756–1757.
- Henderson, J.T., Chopko, A.L., van Wassenaar, P.D. (1992). Purification and primary structure of pediocin PA-1 produced by *Pediococcus acidilactici* PAC-1.0. *Arch Biochem Biophys*, 295(1): 5–12.
- Heng, N.C.K., Tagg, J. R. (2006). What's in a name? Class distinction for bacteriocins. *Nat Rev Microbiol*, 4.

- Hickey, R.M., Twomey, D.P., Ross, R.P., Hill, C. (2003). Production of enterolysin A by a raw milk enterococcal isolate exhibiting multiple virulence factors. *Microbiology*, 149(Pt 3) : 655–664.
- Hilali, L., Khattabi, A., Nssarlah, N., Malki, A., Finance, C. (2002). Isolement des nouvelles souches d'actinomycètes productrices de substances antifongiques à partir du milieu naturel marocain. *Rev Biol Biotech*, 2(1) : 49–53.
- Ho, T.N.T. (2008). Étude de la flore lactique du Nem Chua, produit carné fermenté cru traditionnel du sud Vietnam et maîtrise du processus de fermentation par ajout de souches lactiques sélectionnées spécifiques du produit. Thèse de Doctorat en Sciences des Aliments et Nutrition. Université Bordeaux 1. France. 182 p.
- Hobbs, G., Frazer, C. M., Gardner, D.C.J., Cullum, J. A., Olivier, S. G. (1989). Dispersed growth of *Streptomyces* in liquid culture. *Appl Microbiol Biotechnol*, 31(3): 272–277.
- Hodgson, D.A. (1992). Differentiation in actinomycetes. In: Prokaryotic Structure and Function, Cambridge University Press, Cambridge.
- Hoffmann, J.A., Kafatos, F.C., Janeway, C.A., Ezekowitz, R.A. (1999). Phylogenetic Perspectives in Innate Immunity. *Science*, 254(5418): 1313–8.
- Holt J.G., Krieg N.R., Sneath P.H.A., Staley J.T., Williams S.T. (Eds) (2000). *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*, Lippincott Williams & Wilkins (Philadelphia), 9th Edition. pp 619-623.
- Holt, J.G., Krieg, N.R., Sneath P.H.A., Staley, J.T., Williams, S.T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Williams and Wilkins, Baltimore.
- Höltzel, A. , Gänzle, M. G., Nicholson, G. J., Hammes, W. P., Jung, G. (2000). The first low molecular weight antibiotic from lactic acid bacteria: reutericyclin, a new tetramic Acid. *Angew Chem Int Ed Engl*, 39(15): 2766–2768.
- Hopwood, D.A. (1973). Genetics of the Actinomycetales. *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, 2: 131–53.
- Hopwood, D.A. (2003). *Streptomyces* genes: from Waksman to Sanger. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 30(8): 468–471.
- Hopwood, D.A. (2006). Soil to genomics: the *Streptomyces* chromosome. *Annu Rev Genet*, 40: 1–23.
- Hopwood, DA. (2007). *Streptomyces* in Nature and Medicine: The Antibiotic Makers. New York, Oxford University Press.
- Horinouchi, S., Beppu, T. (1994). A factor as a microbial hormone that controls cellular differentiation and secondary metabolism in *Streptomyces griseus*. *Mol Microbiol*, 12(6) : 859–864.
- Hsu, S.T., Breukink, E., Tischenko, E., Lutters, M.A., de Kruijff, B., Kaptein, R., Bonvin, A.M., van Nuland, N.A. (2004). The nisin-lipid II complex reveals a pyrophosphate cage that provides a blueprint for novel antibiotics. *Nat Struct Mol Biol*, 11(10): 963–967.
- Hühne, K., Axelsson, L., Holck, A., Kröckel, L. (1996). Analysis of the sakacin P gene cluster from *Lactobacillus sake* Lb674 and its expression in sakacin-negative Lb. sake strains. *Microbiology*, 142 (Pt 6): 1437–1448.

Hwang, B.K., Lim, S.W., Kim, J.Y., Lee, J.Y., Moon, S.S. (2001). Isolation and in vivo and invitro antifungal activity of phenylacetic acid and sodium phenylacetate from *Streptomyces humidus*. *Appl Environ Microbiol*, 67(8): 3739–3745.

I

Islam, M.R., Jeong, Y.T., Ryu, Y.J., Song, C.H., Lee, Y.S. (2009). Isolation, Identification and Optimal Culture Conditions of *Streptomyces albidoflavus* C247 Producing Antifungal Agents against *Rhizoctonia solani* AG2-2. *Mycobiology*, 37(2): 114-20.

Iwatsuki, M., Tomoda, H., Uchida, R., Gouda, H., Hirono, S., Ōmura, S. (2006). Lariatins, antimycobacterial peptides produced by *Rhodococcus* sp. K01–B0171, have a lasso structure. *J Am Chem Soc*, 128(23): 7486–7491.

J

Jack, R. W., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (1998). Lantibiotics and Related Peptides. In: Jack, R. W., Bierbaum, G., Sahl, H.-G. (Eds). *Lantibiotics and Related Peptides*. Springer Verlag. GeorgesTown, USA. Pp

Jack, R.W., Tagg, J.R., Ray, B. (1995). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Microbiol Rev*, 59(2): 171–200.

Jana, S., Deb, J.K. (2006). Molecular understanding of aminoglycoside action and resistance. *Appl Microbiol Biotechnol*, 70(2): 140–150.

Jasniewski, J. (2008). Etude des mécanismes d'action de bactériocines de la sous-classe IIa. Thèse de doctorat, Institut national polytechnique de Lorraine, Spécialité : Procédés Biotechnologiques et Alimentaires. 132 p.

Jensen, H.L. (1931). Proc. Linnean Soc. N. S. Wales, 56, 334–370.

Jensen, H.L. (1932). Idem, 57, 364–376.

Jensen, P.R., Dwight, R., Fenical, W. (1991). Distribution of actinomycetes in near-shore tropical marine sediments. *Appl Environ Microbiol*, 57(4):1102–1108.

Johnsen, L., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. (2005). The C-terminal domain of pediocin-like antimicrobial peptides (class IIa bacteriocins) is involved in specific recognition of the C-terminal part of cognate immunity proteins and in determining the antimicrobial spectrum. *J Biol Chem*, 280(10): 9243–9250.

Jones, K.L. (1949). Fresh isolates of actinomycetes in which the presence of sporogenous aerial mycelia is a fluctuating characteristic. *J Bacteriol*, 57: 141–145.

Jung, W.J., Mabood, F., Souleimanov, A., Smith, D.L. (2011). Induction of defense-related enzymes in soybean leaves by class IId bacteriocins (thuricin 17 and bacthuricin F4) purified from *Bacillus* strains. *Microbiol Res*, 167(1):14–19.

Jung, Y.L, Byung, K.H. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol*, 48(5): 407–417.

K

Kacem, M., Karam, N.E. (2006). Physicochemical and microbiological study of “shmen”, a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites*, 57(2): 198–204.

- Kaletta, C., Entian, K.D., Jung, G. (1991). Prepeptide sequence of cinnamycin (Ro 09-0198): the first structural gene of a duramycin-type lantibiotic. *Eur J Biochem*, 199(2): 411–415.
- Kamoun, F., Mejdoub, H., Aouissaoui, H., Reinbolt, J., Hammami, A., Jaoua, S. (2005). Purification, amino acid sequence and characterization of Bacthuricin F4, a new bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J Appl Microbiol*, 98(4): 881–888.
- Kang, M.J., Strap, J.L., Crawford, D.L. (2010). Isolation and characterization of potent antifungal strains of the *Streptomyces violaceusniger* clade active against *Candida albicans*. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 37(1): 35–41.
- Katahira, R., Shibata, K., Yamasaki, M., Matsuda, Y., Yoshida, M. (1995). Solution structure of endothelin B receptor selective antagonist RES-701-1 determined by 1H NMR spectroscopy. *Bioorg Med Chem*, 3(9): 1273–1280.
- Katahira, R., Yamasaki, M., Matsuda, Y., Yoshida, M. (1996). MS-271, a novel inhibitor of calmodulin-activated myosin light chain kinase from *Streptomyces* sp. II – Solution structure of MS-271: characteristic features of the “lasso” structure. *Bioorg Med Chem*, 4(1): 121–129.
- Kattere, T., Andoren O. (2001). The ICBM of analytically solved models of soil carbon, nitrogen and microbial biomass dynamics — descriptions and application examples. *Ecol Model*, 136(2-3): 191–207.
- Kauffman, C.A., Carver, R.L. (1997). Antifungal agents in the 1990s: Current status and future developments. *Drugs*, 53(4): 539–549.
- Kawai, Y., Ishii, Y., Arakawa, K., Uemura, K., Saitoh, B., Nishimura, J., Kitazawa, H., Yamazaki, Y., Tateno, Y., Itoh, T., Saito, T. (2004). Structural and functional differences in two cyclic bacteriocins with the same sequences produced by lactobacilli. *Appl Environ Microbiol*, 70(5): 2906–2911.
- Kersten, R., Yang, Y.-L., Xu, Y., Cimermanic, P., Nam, S.-J., Fenical, W., Fischbach, M., Moore, B., Dorrestein, P. (2011). A mass spectrometry-guided genome mining approach for natural product peptidogenomics. *Nat Chem Biol*, 7(11): 794–802.
- Keulen, G.V., Jonkers, H.M., Cloesson, D.L.D., Woston H.A.B. (2003). Differentiation and anaerobiosis in standing liquid cultures of *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 185(4): 1455–1458.
- Kieser, T., Bibb M.J., Buttner M.J., Chater K.F., Hopwood D.A. (2000). Practical *Streptomyces* genetics. John Innes Centre, Norwich Research Park.
- Kim, D.W., Chater, K., Lee, K.J., Hesketh, D. (2005). Changes in the extracellular proteome caused by the absence of the *bldA* gene product, a developmentally significant tRNA, reveal a new target for the pleiotropic regulator AdpA in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 187(9): 2957–2966.
- Kim, J.K., Liu, Q.M., Park, H.Y., Kang, M.S., Kim, S.C., Im, W.T., Yoon, M.H. (2013). *Nocardioides panaciterrulae* sp. nov., isolated from soil of a ginseng field, with ginsenoside converting activity. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 103(6): 1385–1393.
- Kimura, K.-I., Kanou, F., Takahashi, H., Esumi, Y., Uramoto, M., Yoshihama, M. (1997). Propeptin, a new inhibitor of prolyl endopeptidase produced by *Microbispora*. I - Fermentation, isolation and biological properties. *J Antibiot(Tokyo)*, 50(5): 373–378.

- Kitouni, M. (2007). Isolement de bactéries actinomycétales productrices d'antibiotiques à partir d'écosystèmes extrêmes. Identification moléculaire des souches actives et caractérisation préliminaire des substances élaborées. Thèse de Doctorat en Microbiologie appliquée. Université Mentouri-Constantine. Algérie. 170p.
- 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 Med Mycol*, 15(1) : 45–51.
- Klaenhammer, T.R. (1988). Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie*, 70(3): 337-349.
- Klaenhammer, T.R. (1993). Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol Rev*, 12(1-3): 39–85.
- Knappe, T., Linne, U., Xie, X., Marahiel, M. (2010). The glucagon receptor antagonist BI-32169 constitutes a new class of lasso peptides. *FEBS Lett*, 584(4): 785–789.
- Koglin, A., Walsh, C. T. (2009). Structural insights into nonribosomal peptide enzymatic assembly lines. *Nat Prod Rep*, 26(8): 987-1000.
- Kostinek, M., Specht, I., Edward, V.A., Schillinger, U., Hertel, C., Holzapfel, W.H., Franz, C.M. (2005). Diversity and technological properties of predominant lactic acid bacteria from fermented cassava used for the preparation of Gari, a traditional African food. *Syst Appl Microbiol*, 28(6): 527–540.
- Krainsky, A., (1944). *Centralbl. f. Bakt. Parasitenk. II Abt*, 41, 649-688.
- Krassilnikov, N. A. (1938). *Microbiologia (U.S.S.R.)*, 7, 335.
- Krieg, N.R. The Archaea and the deeply branching and phototrophic bacteria - Identification of procaryotes. In *Bergey's Manual of systematic Bacteriology*. Garrity, G. M., Boone D. R., Castenholz, R. W. Williams and Wilkins, Baltimore (2001), 721: 33–38.
- Krishnamurthi, S., Chakrabarti, T. (2013). Diversity of bacteria and archaea from a landfill in Chandigarh, India as revealed by culture-dependent and culture-independent molecular approaches. *Syst Appl Microbiol*, 36(1): 56–68.
- Krull, R.E., Chen, P., Novak, J., Kirk, M., Barnes, S., Baker, J., Krishna, N. R., Caufield, P.W. (2000). Biochemical structural analysis of the lantibiotic mutacin II. *J Biol Chem*, 275(21): 15845–50.
- Kumar, V., Bharti, A., Gusain, O.P., Bisht, G.S. (2010). An improved method for isolation of genomic DNA from filamentous actinomycetes. *J Sci Engg & Tech Mgt*, 2: 10–13.
- Kutzner, H.J. (1981). The family *Streptomycetaceae*. In the prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria. Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows A., and Schegel H. (eds). *Berlin: Springer-Verlag KG,pp*.
- Kutzner, K.J. (1986). The family *Streptomycetaceae*. In: Starr, M.P., Stolp, H., Truper, H.G., Balows, A., and Schlegel, H.G. (Eds.). *The prokaryotes, A Handbook on Habitats, Isolation, and Identification of Bacteria*. Springer. 2: 2028–2090.

L

- Lacey, J. (1973). Actinomycetes in soils, composts and fodders. In: *Actinomycetales: characteristics and practical importance*. Eds.: G. Sykes, F.A. Skinner. Academic press, London, New York. 231–251.

- Lacey, J. (1997). Actinomycetes in composts. *Ann Agric Environ Med*, 4: 113–121.
- Lacroix, S. (2008). Étude des mécanismes physiologiques et moléculaires de la filamentation de *Sphaerotilus natans*, bactérie modèle du foisonnement invasif en boues activées. Thèse de Doctorat en Mise en œuvre de fonctions biologiques. Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (AgroParisTech). France. 303p.
- Lahsaoui, S. (2009). Etude de procédé de fabrication d'un fromage traditionnel (Klila). Mémoire d'Ingénieur d'Etat en Agronomie. Université El Hadj Lakhdar Batna.
- Larpent, J.P., Larpent-Gourgand, M. (1997). Mémento technique de microbiologie. 3^{ème} Edition, Tech & doc., Lavoisier. 1039p.
- Larpent, J.-P., Larpent-Gourgaud, M. (1985). Éléments de Microbiologie. Hermann. Paris. 264 p.
- Larpent, J.P., Sanglier, J.J. (1989). Biotechnologie des antibiotiques. Ed. Masson. Paris, 481p.
- Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A., Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Appl Environ Microbiol*, 66(9): 4084–4090.
- Le Minor, L., Veron, M. (1989). Bacteriologie medicale. 2^{ème} édition. *Medecine. Sciences Flammarion*.
- Leadbelter, J. R., (2003). Cultivation of recalcitrant microbes: cells are alive, well and revealing their secrets in the 21st century laboratory. *Curr Opin Microbiol*, 6(3) : 274–281.
- Lechevalier, H. A., Lechevalier, M.P. (1981). Introduction to the order Actinomycetales. In: The prokaryotes, Vol. 2 (Starr M. P., H. Stolp, H. G. Truper, A. Ballows and H. G. Schlegel. Eds.), Springer – Verlag, Berlin. p. 1915–1922.
- Lechevalier, H.A., Lechevalier, M.P. (1967). Biologie of actinomycetes. *Ann Rev Microbiol*, 21: 71–100.
- Lechevalier, M.P., Bievre, C.D., Lechevalier H. (1977). Chemotaxonomie of aerobic Actinomycetes : phospholipides composition. *Bioch Syst Ecol*, 5(4): 249–260.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H. (1970). Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. *Int J Syst Bacteriol*, 20: 435–443.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H. (1985). Biology of actinomycetes not belonging to genus *Streptomyces* In: Biology of industrial microorganisms. The Benjamin Cummings Publishing Company, INC. pp 315–360.
- Lechevalier, M.P., Lechevalier, H.A. (1980). The chemotaxonomy of actinomycetes. In: microbiology thayer, Actinomycete taxonomy. Eds: A. DIETZ, D.W. Society for industrial SIM special publication number 6. Arlington, Virginia USA. pp 225–291.
- Lee, J.Y., Hwang, B. K. (2002). Diversity of antifungal actinomycetes in various vegetative soils of Korea. *Can J Microbiol*, 48(5): 407–417.
- Lehrer, R.I., Ganz, T. (1996). Endogenous Vertebrate Antibiotics. Defensins, Protegrins, and Other Cysteine-Rich Antimicrobial Peptides. *Ann N Y Acad Sci*, 797: 228–39.
- Lehrer, R.I., Ganz, T. (1999). Antimicrobial Peptides in Mammalian and Insect Host Defence. *Curr Opin Immunol*, 11(1) : 23–27.

- Lemriss, S., Laurent, F., Couble, A., Casoli, E., Lancelin, J. M., Saintpierre-Bonaccio, D., Rifai, S., Fassouane, A., Boiron, P. (2003). Screening of nonpolyenic antifungal metabolites produced by clinical isolates of actinomycetes. *Can J Microbiol*, 49(11): 669–674.
- Lewns, C.B., Sun, S., Moutville, T.J. (1992). Production of an Amvlase-Sensitive Bacteriocin by an Atypical *Leuconostoc paramesenteroides* Strain. *Appl Environ Microbiol*, 58 (1) : 143–149.
- Lieske, R., (1921). Morphologie und Biologie der Strahlenpilze, Lipsia.
- Lin, Y.S., Kieser, H.M., Hopwood, D.A., Chen C.W. (1993). The chromosomal DNA of *Streptomyces lividans* 66 is linear. *Mol Microbiol*, 10(5): 923–33.
- Lindholm, P., Kortemaa, H., Kokkola, M., Haahtela, K., Salkinoja-Salonen, M., Valkonen, J.P.T. (1997). *Streptomyces* spp. Isolated from potato scab lesions under Nordic conditions in Finland. *Plant Dis*, 81(11): 1317–1322.
- Loqman, S. (2009). La lutte biologique contre la pourriture grise de la vigne : Isolement, caractérisation de souches de bactéries Actinomycétales antagonistes à partir des sols rhizosphériques de vignes saines sauvages d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Biologie et Physiologie Végétale. Université de Reims Champagne-Ardenne. France. 216p.
- Ludwig, W., Schleifer, K-H., Whitman, W.B. Bergey's taxonomic outlines - Revised Road Map to the Phylum Firmicutes. 2008, vol. 3. Disponible sur http://www.bergeys.org/outlines/Bergeys_Vol_3_Outline.Pdf
- Lyons, A.J., Pridham T.G. (1971). *Streptomyces torulosus* sp. n., an unusual knobby-spored taxon. *Appl Microbiol*, 22(2): 190–3.

M

- Makhloufi, K.M. (2011). Caractérisation d'une bactériocine produite par une bactérie lactique *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolée du boza. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biochimie. Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. France. 200p.
- Maksimov, M., Pan, S., Link, J. (2012). Lasso peptides: structure, function, biosynthesis, and engineering. *Nat Prod Rep*, 29(9): 996–1006.
- Maksimov, M.O., Link, A.J. (2014). Prospecting genomes for lasso peptides. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 41(2):333–44.
- Malik, V.S. (1972). Chloramphenicol. *Adv Appl Microbiol*, 15: 297–336.
- Mancini, A., Lazzi, C., Bernini, V., Neviani, E., Gatti, M. (2012). Identification of dairy lactic acid bacteria by tRNA^{Ala}-23S rDNA-RFLP. *J Microbiol Methods*, 91(3): 380–390.
- Marahiel, M. A., Essen, L. O. (2009). Chapter 13. Nonribosomal peptide synthetases mechanistic and structural aspects of essential domains. *Methods Enzymol*, 458: 337–351.
- Marchal, N., Bourdon, J. L. (1991). Les milieux de culture pour l'isolement et l'identification biochimique des bactéries. Doin éditeurs –Paris. 509p.
- Margalith, P. L. (1992). Pigment microbiology. First edition Chapman et Hall. 5–15.
- Mariat, F., Sebald M. (1990). Les actinomycetes. Dans : Bactériologie médicale. Le Minor. Edition Médecine-Science. Flammarion. France.

- Matamoros, S. (2008). Caractérisation de bactéries lactiques psychrotrophes en vue de leur utilisation dans la biopréservation des aliments. Étude physiologique et moléculaire des mécanismes d'adaptation au froid. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université de Nantes. 189 p.
- McAuliffe, O., Ross, R.P., Hill, C. (2001). Lantibiotics: structure, biosynthesis and mode of action. *FEMS Microbiol Rev*, 25(3): 285–308.
- McCormick, J.R., Flårdh, K. (2012). Signals and regulators that govern *Streptomyces* development. *FEMS Microbiol Rev*, 36(1): 206–31.
- McLeod, A., Nyquist, O. L., Snipen, L., Naterstad, K., Axelsson, L. (2008). Diversity of *Lactobacillus sakei* strains investigated by phenotypic and genotypic methods. *Syst Appl Microbiol*, 31(5): 393–403.
- Meklat, A., Sabaou, N., Zitouni, A., Mathieu F., Lebrihi, A. (2011). Isolation, Taxonomy, and Antagonistic Properties of Halophilic Actinomycetes in Saharan Soils of Algeria. *Appl Environ Microbiol*, 77(18) : 6710–6714.
- Mendes, T.D., Borges, W.S., Rodrigues, A., Solomon, S.E., Vieira, P.C., Duarte, M.C., Pagnocca, F.C. (2013). Anti-Candida properties of urauchimycins from Actinobacteria associated with trachymyrmex ants. *Biomed Res Int*, 2013: 835081, 9 p.
- Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M., Elyachioui, M. (2007). Microbial Characteristics of Klila and Jben Traditionnal Moroccan Cheese from Raw Cow's Milk. *World J Dairy Food Sci*, 2 (1): 23–27.
- Miguélez, E.M., Hardisson, C., Manzanal, M.B. (1999). Hyphal death during colony development in *Streptomyces antibioticus*: morphological evidence for the existence of a process of cell deletion in a multicellular prokaryote. *J Cell Biol*, 145(3): 515–25.
- Monciardini, P., Cavaletti, L., Schumann, P., Rohde, M., Donadio S. (2003). *Conexibacter Woesei* gen nov., sp. nov. a novel representative of a deep evolutionary line of descent within the class Actinobacteria. *Inter J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 2): 3–10.
- Morishita, Y., Chiba, S., Tsukuda, E. Tanaka, T., Ogawa, T., Yamasaki, M., Yoshida, M., Kawamoto, I., Matsuda, Y. (1994). RES-701-1, a novel and selective endothelin type B receptor antagonist produced by *Streptomyces* sp. RE-701. I - Characterization of producing strain, fermentation, isolation, physico-chemical and biological properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 47(3): 269–275.
- N**
- Nes, I. F., Diep, D. B., Holo, H. (2007). Bacteriocin diversity in *Streptococcus* and *Enterococcus*. *J Bacteriol*, 189(4): 1189–1198.
- Nielsen, D.S., Jacobsen, T., Jespersen, L., Koch, A.G., Arneborg, N. (2008). Occurrence and growth of yeasts in processed meat products - Implications for potential spoilage. *Meat Sci*, 80(3): 919–926.
- Ninane, V., Mukandayambaje, R., Berben, G. (2009). Probiotiques, aliments fonctionnels et kéfir : le point sur la situation réglementaire en Belgique et sur les avancées scientifiques en matière d'évaluation des effets santé du kéfir. *Biotechnol Agron Soc Environ*, 13(3) : 459–466.
- Niraula, N.P., Shrestha, P., Oh, T.J., Sohng, J.K. (2010). Identification and characterization of a NADH oxidoreductase involved in phenylacetic acid degradation pathway from *Streptomyces peucetius*. *Microbiol Res*, 165(8): 649–56.

- Nissen-Meyer, J., Nes, I. F. (1997). Ribosomally synthesized antimicrobial peptides: their function, structure, biogenesis, and mechanism of action. *Arch Microbiol*, 167(2-3): 67–77.
- Nissen-Meyer, J., Rogne, P., Oppegard, C., Haugen, H.S., Kristiansen, P.E. (2009). Structure-function relationships of the non-lanthionine-containing peptide (class II) bacteriocins produced by gram-positive bacteria. *Curr Pharm Biotechnol*, 10(1): 19–37.
- Nodwell, J.R., Losick, R. (1998). Purification of an extracellular signalling molecule involved in production of aerial mycelium by *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 180(5): 1334–1337.
- Nolan, E.M., Walsh, C.T. (2009). How nature morphs peptide scaffolds into antibiotics. *ChemBiochem*, 10(1): 34–53.
- O**
- Ogawa, T., Ochiai, K., Tanaka, T., Tsukuda, E., Chiba, S., Yano, K., Yamasaki, M., Yoshida, M., Matsuda, Y. (1995). RES-701-2, -3 and -4, novel and selective endothelin type B receptor antagonists produced by *Streptomyces* sp. I - Taxonomy of producing strains, fermentation, isolation, and biochemical properties. *J Antibiot (Tokyo)*, 48(11):1213–1220.
- Okami, Y., Hotta, K. (1988). Search and discovery of new antibiotics. In: Goodfellow M, Williams ST, Mordarski M, editors. Actinomycetes in biotechnology. New York: Academic Press, Inc; p.33-67.
- Olson, E.H. (1968). Actinomycetes Isolation Agar. In Difco: Supplementary Literature. Difco Lab., Detroit, Michigan.
- Omura, S. (1992) The search for bioactive compounds from microorganisms. Springer, Verlag, New York.
- Oppegård, C., Rogne, P., Emanuelsen, L., Kristiansen, P. E., Fimland, G., Nissen-Meyer, J. (2007). The two-peptide class II bacteriocins: structure, production, and mode of action. *J Mol Microbiol Biotechnol*, 13(4): 210–219.
- Oppegard, L.M., Hamann, B.L., Streck, K.R., Ellis, K.C., Fiedler, H.P., Khodursky, A.B., Hiasa, H. (2009). In vivo and in vitro patterns of the activity of simocyclinone D8, an angucyclinone antibiotic from *Streptomyces antibioticus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 53(5): 2110–9.
- Orla-Jensen, S. (1919). The Lactic Acid Bacteria. Copenhagen: Host and Son.
- Orskov, J., (1923). Investigations into the morphology of the ray-fungi. Copenhagen.
- Oskay, M., Tamer, A.Ü., Azeri, C. (2004). Antibacterial activity of some actinomycetes isolated from farming soils of Turkey. *Afr J Biotechnol*, 3(9): 441–446.
- Oswald, E.T., Ferchau, H.A. (1968). Bacterial associations of coniferous mycorrhizae. *Plant Soil*, 28: 187–192.
- Ottow, J.C.G., Glathe, H. (1968). Rose Bengal-malt extract-agar, a simple medium for the simultaneous isolation and enumeration of fungi and actinomycetes from soil. *Appl Microbiol*, 16(1): 170–171.
- Ouadghiri, M. (2009). Biodiversité des bactéries lactiques dans le lait cru et ses dérivés « Lben » et « Jben » d'origine marocaine. Thèse de Doctorat en Microbiologie et Biologie Moléculaire. Université Mohammed V-Agdal. Maroc. 132 p.

- Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M., Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiol Lett*, 251(2): 267–271.
- Ouhdouch, Y. (1989). Bactéries actinomycétales rares productrices d'antifongiques. Thèse de Doctorat . Université de Nancy.
- Ouhdouch, Y., Barakate, M., Finance, C. (2001). Actinomycetes of maroccan habitats : isolation and screening for antifungal activities. *Eur J Biol*, 37(2): 69–74.
- Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Glover, R.L., Jespersen, L. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiol*, 32(1): 72–78.

P

- Pernodet, J.L. (2010). Institut de Génétique et Microbiologie UMR 8621, Université de Paris Sud. <http://www.igmors.u-psud.fr/spip.php?article984&lang=fr>
- Perry, J.J., Staley, J.T., Lory, S. (2004). Microbiologie. Dunod, Pais. 497–498.
- Petit, V. (2009). Peptides antimicrobiens de procaryotes et d'eucaryotes : des structures aux mécanismes d'action. Thèse de Doctorat, Spécialité : Méthodes spectroscopiques, Université Pierre et Marie Curie. 307 p.
- Petrosyan, P., Garcia-Varela, M., Luz-Madrigal, A., Huitron, C., Flores, M. E. (2003). *Streptomyces mexicanus* sp. nov., a xylanolytic microorganism isolated from soil. *Inter J Syst Evol Microbiol*, 53(Pt 1): 269–273.
- Pirotta, M., Gunn, J., Chondros, P., Grover, S., O'Malley, P., Hurley, S., Garland, S. (2004). Effect of Lactobacillus in preventing post-antibiotic vulvovaginal candidiasis: a randomised controlled trial. *BMJ*, 329(7465): 548-52.
- Pirouz, T., Karbasian, M.A., Goodfellow, M. (1999). Isolation of some aerobic actinomycetes species from the soil of Zahedan County, South-East of Iran. *Iran J Med Sci*, 24: 65–67.
- Pons, A.M., Lanneluc, I., Cottenneau, G., Sable, S. (2002). New developments in non-post translationally modified microcins. *Biochimie*, 84(5-6): 531–537.
- Porter, J.N. (1971). Prevalance and distribution of antibiotic producing actinomycetes. *Adv Appl Microbiol*, 14: 73–92.
- Porter, J.N., Wilhem, J.J., Tresner, H.D. (1960). Method for the preferential isolation of actinomycetes from soil. *Appl Microbiol*, 8(3) : 174–178.
- Postec, A. (2005). Diversité de populations microbiennes thermophiles d'une cheminée hydrothermale océanique : cultures d'enrichissement en bioréacteur et isolement d'espèces nouvelles. Thèse de Doctorat en Microbiologie, Biologie Végétale et Biotechnologies. Université de Provence (Aix-Marseille I). 239p.
- Pot, B. (2008). The taxonomy of lactic acid bacteria. In: Corrieu, G., and Luquet, F. M. (Eds). Bactéries lactiques. De la génétique aux ferments. Lavoisier. Paris, France pp 1–152.
- Potterat, O., Wagner, K., Gemmecker, G., Mack, J., Puder, C., Vettermann, R., Streicher, R. (2004). BI-32169, a bicyclic 19-peptide with strong glucagon receptor antagonist activity from *Streptomyces* sp. *J Nat Prod*, 67(9): 1528–1531.
- Prasch, T., Naumann, T., Markert, R.L., Sattler, M., Schubert, W., Schaal, S., Bauch, M., Kogler, H., Griesinger, C. (1997). Constitution and solution conformation of the

- antibiotic mersacidin determined by NMR and molecular dynamics. *Eur J Biochem*, 244(2): 501–512.
- Prescott, L., Harley, J.P., Klein D.A. (1995). Microbiologie tome II. De Boeck, Bruxelles. pp 506–517.
- Prescott, L., Harley, J.P., Klein, D.A. (2003). Microbiologie. De Boek Ed (Berlin), 2^{ème} édition, pp 539.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein D.A. (2007). Microbiologie. De Boek & Larcier, Bruxelles: 805–825.
- Pridham, T.G., Gottlieb D. (1948). The utilization of carbon compounds by some actinomycetales as an aid for species determination. *J Bacteriol*, 56(1) : 107–114.
- Prinzis, S. (1990). Isolement et caractérisation de souches d'actinomycétales. Purification et étude structurale de leurs métabolites antifongiques. Thèse de Doctorat en Sciences Biologiques Fondamentales et Appliquées. Université Claude Bernard, Lyon I. France. 194p.
- Prioult, G. (2003). Effet des probiotiques sur l'induction et le maintien de la tolérance orale à la β -lactoglobuline chez la souris et étude de leurs mécanismes d'action. Thèse de Doctorat en Sciences et technologie des aliments. Université Laval. Canada. 157p.
- Procópio, R.E., Silva, I.R., Martins, M.K., Azevedo, J.L., Araújo, J.M. (2012). Antibiotics produced by *Streptomyces*. *Braz J Infect Dis*, 16(5): 466–471.

Q

- Quiberoni, A., Rezaiki, L., El Karoui, M., Biswas, I., Tailliez, P., and Gruss, A. (2001). Distinctive features of homologous recombination in an 'old' microorganism, *Lactococcus lactis*. *Res Microbiol*, 152(2): 131–139.

R

- Reading, C., Cole M. (1977). Clavulanic acid: a beta-lactamase-inhiting beta-lactam from *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother*, 11(5): 852–7.
- Reichl, U., King, R., Gilles, E.D. (1992). Characterization of pellet morphology during submerged growth of *Streptomyces tendae* by image analysis. *Biotechnol Bioeng*, 39(2): 164–170.
- Reponen, T.A., Gazenko, S.V., Grinshpun, S.A., Willeke, K., Cole, E.C. (1998). Characteristics of Airborne Actinomycete Spores. *Appl Environ Microbiol*, 64 (10): 3807–3812.
- Rheims, H., Spröer, C., Rainey, F.A., Stackebrandt, E. (1996). Molecular biological evidence for the occurrence of uncultured members of the actinomycete line of descent in different environments and geographical locations. *Microbiology*, 142 (Pt 10): 2863–70.
- Richards, L.A. (1969). Diagnosis and improvement of saline and alkali soils. USDA Agricultural Handbook No. 60. United States Salinity Laboratory Staff, Riverside. California.
- Riley, M.A., Goldstone, C.M., Wertz, J.E., Gordon, D. (2003). A phylogenetic approach to assessing the targets of microbial warfare. *J Evol Biol*, 16(4): 690–697.

- Riley, M.A., Gordon, D.M. (1999). The ecological role of bacteriocins in bacterial competition. *Trends Microbiol*, 7(3): 129–133.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002a). Bacteriocins: evolution, ecology, and application. *Annu Rev Microbiol*, 56: 117–137.
- Riley, M.A., Wertz, J.E. (2002b). Bacteriocin diversity: ecological and evolutionary perspectives. *Biochimie*, 84(5-6): 357–364.
- Rodrigues, U. M., Aguirre, M., Facklam, R. R., Collins, M. D. (1991). Specific and intraspecific molecular typing of lactococci based on polymorphism of DNA encoding rRNA. *J Appl Bacteriol*, 71(6): 509–516.
- Rosengren, J., Craik, D. (2009). How bugs make lassos. *Chem Biol*, 16(12): 1211–1212.
- Rossi-Doria, T. (1891). Ann. Igiene Sper. Roma, 1 (n.s.), 339–428.
- Royet, J., Dziarski, R. (2007). Peptidoglycan recognition proteins: pleiotropic sensors and effectors of antimicrobial defences. *Nat Rev Microbiol*, 5(4): 264–77.
- Ruas-Madiedo, P., Alting, A.C., Zoon, P. (2005). Effect of exopolysaccharides and proteolytic activity of *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* strains on the viscosity and structure of fermented milks. *Int Dairy J*, 15(2): 155–164.
- Ruiz, F. O., Gerbaldo, G., Asurmendi, P., Pascual, L. M., Giordano, W., Barberis, I. L. (2009). Antimicrobial activity, inhibition of urogenital pathogens, and synergistic interactions between *Lactobacillus* strains. *Curr Microbiol*, 59(5): 497–501.

S

- Saadoun, L., Al moumani, F. (1997). *Streptomyces* from Jordan soils active against *Agrobacterium tumefaciens*. *Actinomycetes*, 8(1-2) : 29–36.
- Sabaou, N. (1988). Contribution à l'étude des Actinomycètes des sols des palmeraies Algériennes: systématique et écologie. Thèse de Doctorat en Microbiologie des sols. Université des Sciences et de la technologie Houari Boumediene. Alger. 192p.
- Sablon, E., Contreras, B., Vandamme, E. (2000). Antimicrobial peptides of lactic acid bacteria: mode of action, genetics and biosynthesis. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 68: 21–60.
- Sachindra, N.M., Sakhare, P.Z., Yashoda, K.P., Narasimha Rao, D. (2005). Microbial profile of buffalo sausage during processing and storage. *Food Control*, 16(1): 31–35.
- Şahin, N., Uçur, A. (2003). Investigation of the Antimicrobial Activity of Some *Streptomyces* Isolates. *Turk J Biol*, 27(2): 79–84.
- Salomón, R., and Farías, R. (1992). Microcin 25, a novel antimicrobial peptide produced by *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 174(22): 7428–7435.
- Salveti, E., Fondi, M., Fani, R., Torriani, S., Felis, G.E. (2013). Evolution of lactic acid bacteria in the order Lactobacillales as depicted by analysis of glycolysis and pentose phosphate pathways. *Syst Appl Microbiol*, 36(5): 291–305.
- Sanglier, J.J., Trujill M., (1997). Substances bioactives produites par les actinomycetes, strategie de selection de souches. *Bull Soc Fr Microbiol*, 12(3): 269–276.
- Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Savadogo, P.W., Ouattara, A.S., Barro, N., Traore, A.S. (2004). Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pak J Nutr*, 3(2): 134–139.

- Schäfer, J., Jäckel, U., Kämpfer, P. (2010). Development of a new PCR primer system for selective amplification of Actinobacteria. *FEMS Microbiol Lett*, 311(2): 103–112.
- Schleifer, K.H., Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev*, 36(4): 407–77.
- Schofield, G. M., K. P. Schaal (1981). A numerical taxonomic study of members of the *Actinomycetaceae* and related taxa. *J Gen Microbiol*, 127(2):237–259.
- Sevi, A., Massa, S., Muscio, A., Dell'aquila, S., Dantone, D., Catalano, S. (1998). Litter treatment with bentonite or paraformaldehyde: effects on air quality and on milk yield of Comisana ewes. *Zootec Nutr Anim*, 24(5): 213–224.
- Sherk, H.H. (2000). Selman A. Waksman, the Garden State, and the antibiotic revolution. *N J Med*, 97(8): 57-60.
- Shirling, E. B., Gottlieb D. (1976). Retrospective evaluation of International *Streptomyces* Project taxonomy criteria, In: Actinomycetes the boundary microorganisms. Ed: Arai T. Tokyo. 9–42.
- Shirling, E. B., Gottlieb, D. (1966). Methods for characterization of *Streptomyces* species. *Int J Syst Bacteriol*, 16(3): 313–340.
- Shirling, E.B., Gottlieb, D. (1972). Cooperative description of type strains of *Streptomyces*. *Int J Syst Evol Microbiol*, 22(4): 265–394.
- Shomura, T., Yoshida, J., Amano, S., Kojima, M., Inouye, S., Niida, T. (1979). Studies on *Actinomycetales* producing antibiotics only on agar culture. I. Screening, taxonomy and morphology-productivity relationship of *Streptomyces halstedii*, strain SF-1993. *J Antibiot*, 32(5): 427–435.
- Simmonds, R.S., Simpson, W.J., Tagg, J.R. (1997). Cloning and sequence analysis of zooA, a *Streptococcus zooepidemicus* gene encoding a bacteriocin-like inhibitory substance having a domain structure similar to that of lysostaphin. *Gene*, 189(2): 255– 261.
- Slavica, B.I., Sandra, S.K., Zoran, B.T. (2005). Uv/Vis analysis and antimicrobial activity of *Streptomyces* isolates. *Med Biol*, 12(1) : 44–46.
- Smaoui, S. (2010) Purification et Caractérisation de Biomolécules à partir de microorganismes nouvellement isolés et identifiés. Thèse de Doctorat en Génie de Procédés et Environnement. Université de Toulouse. France. 207p.
- Somma, S., Merati, W., Parenti, F. (1977). Gardimycin, a new antibiotic inhibiting peptidoglycan synthesis. *Antimicrob Agents Chemother*, 11(3): 396–401.
- Song, J., Weon, H.Y., Yoon, S.H., Parrk, D.S., Go, S.G., Suh, J. W. (2001). Phylogenetic diversity of thermophilic actinomycetes and *Thermoactinimycetes* isolated from mushroom composts in Korea based on 16S rRNA gene sequence analysis. *FEMS Microbiol Lett*, 202(1): 97–102.
- Sprusansky, O., Zhou, L., Jordan, S., White, J., Wespeling, J. (2003). Identification of three new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol*, 185 (20): 6147–6157.
- Stackebrandt, E., Rainey, F.A., Ward-Rainey, N.L. (1997). Proposal for a new hierarchic classification system, *Actinobacteria* classis nov. *Int J Syst Evol Microbiol*, 47(2): 479–491.

- Staneck, J. L., Roberts, G. D. (1974). Simplified approach to identification of aerobic Actinomycetes by thin-layer chromatography. *Appl Microbiol*, 28(2): 226–231.
- Suela Silva, M., Naves Sales, A., Teixeira Magalhães-Guedes, K., Ribeiro Dias, D., Schwan, R.F. (2013). Brazilian Cerrado soil Actinobacteria ecology. *Biomed Res Int*, 2013: 503805.
- Suzuki, S., Okuda, T., Komatsubara, S. (2001). Selective isolation and study on global distribution of the genus *Planobispora* in soil. *Can J Microbiol*, 47(11): 979–986.
- Sykes, G., Skinner, F.A. (1973). Actinomycetales: Characteristics and practical importance. Academic press. London. New York.

T

- Tagg, J.R., Dajani, A.S., Wannamaker, L.W. (1976). Bacteriocins of gram-positive bacteria. *Bacteriol Rev*, 40(3): 722–756.
- Tamura, S., Park, Y., Toriyama, M., Okabe, M. (1997). Change of mycelial morphology in tyrosin production by batch culture of *Streptomyces fradiae* under various shear conditions. *J Ferment Bioeng*, 83(6): 523–528.
- Tanaka, S., Igarashi, K., Kaji, A. (1972). Studies on the action of tetracycline and puromycin. *J Biol Chem*, 247(1): 45–50.
- Theilleux, J. In Levreau, J.Y., Bouix, M. (1993). Microbiologie industrielle. Les micro-organismes d'intérêt industriel. Lavoisier, Paris. Ch: 6 : 425–481. Technique et documentation. Lavoisier. Paris.
- Thomson, C.J., Power, E., Ruebsamen-Waigmann, H., Labischinski, H. (2004). Antibacterial research and development in the 21(st) Century-an industry perspective of the challenges. *Curr Opin Microbiol*, 7(5):445–50.
- Tichaczek, P. S., Vogel, R. F., Hammes, W. P. (1993). Cloning and sequencing of curA encoding curvacin A, the bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* LTH1174. *Arch Microbiol*, 160(4): 279–283.
- Tolle, A. (1980). The microflora of the udder. *Bull Int Dairy Fed*, 120: 4–10.
- Traut, R.R., Monro, R.E. (1964). The puromycin reaction and its relation to protein synthesis. *J Mol Biol*, 10(1): 63–72.
- Tsunakawa, M., Hu, S., Hoshino, Y., Detlefson, D., Hill, S., Furumai, T., White, R., Nishio, M., Kawano, K., Yamamoto, S. (1995). Siamycins I and II, new anti-HIV peptides. I - Fermentation, isolation, biological activity and initial characterization. *J Antibiot*, 48: 433–434.

V

- Valanarasu, M., Kannan, P., Ezhilvendan, S., Ganesan, G., Ignacimuthu, S., Agastian, P. (2010). Antifungal and antifeedant activities of extracellular product of *Streptomyces* spp. ERI-04 isolated from Western Ghats of Tamil Nadu. *J Med Mycol*, 20(4): 290–297.
- van de Sande, W.W. (2013). Global burden of human mycetoma: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 7(11) : e2550.

- van der Waaij, D., Nord, C.E. (2000). Development and persistence of multi-resistance to antibiotics in bacteria; an analysis and a new approach to this urgent problem. *Int J Antimicrob Agents*, 16(3): 191–7.
- Vandamme, P., Pot, B., Gillis, M., de Vos, P., Kersters, K., Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. *Microbiol Rev*, 60: 407–438.
- Ventura, M., Canchaya, C., Tauch, A., Chandra, G., Fitzgerald, G.F., Chater, K.F., van Sinderen, D. (2007). Genomics of *Actinobacteria*: tracing the evolutionary history of an ancient phylum. *Microbiol Mol Biol Rev*, 71(3): 495–548.
- Veiziris, N., Chauffour, A., Escolano, S., Henquet, S., Matsuoka, M., Jarlier, V., Aubry, A. (2013). Resistance of *M. leprae* to Quinolones: A Question of Relativity?. *PLoS Negl Trop Dis*, 7(11):e2559.
- Vollmer, W., Blanot, D., De Pedro, M.A. (2008). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiol Rev*, 32(2): 149–67.

W

- Waksman, S.A. (1919). *Soil Sci*, 8: 71–215.
- Waksman, S.A. (1959). *The actinomycetes: nature, occurrence and activities*. The Williams and Wilkins Company, Baltimore, 1: 29–46.
- Waksman, S.A., (1967). Distribution, isolation and methods of study. In : *The actinomycetes-a summary of current knowledge*. The Ronald Press Company. New York. pp: 9–21.
- Waksman, S.A., Henrici, A.T. (1943). The nomenclature and classification of the actinomycetes. *J Bacteriol*, 46(4): 337–341.
- Wang, Y., M.E. Henz, N.L. Gallagher, S. Chai, A.C. Gibbs, L.Z. Yan, M.E. Stiles, D.S. Wishart, J.C. Vederas. (1999). Solution structure of carnobacteriocin B2 and implications for structure-activity relationships among type IIa bacteriocins from lactic acid bacteria. *Biochemistry*, 38(47):15438–15447.
- Watve, M.G., Tickoo, R., Jog, M.M., Bhole, B.D. (2001). How many antibiotics are produced by the genus *Streptomyces*?. *Arch Microbiol*, 176(5): 386–90.
- Weber, W., Fischli, W., Hochuli, E., Kupfer, E., Weibel, E.K. (1991). Anantin-a peptide antagonist of the atrial natriuretic factor (ANF). I - Producing organism, fermentation, isolation and biological activity. *J Antibiot*, 44(2): 164–171.
- Wehrli, W., Knüsel, F., Schmid, K., Staehelin, M. (1968) Interaction of rifamycin with bacterial RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 61(2): 667–73.
- Welman, A.D., Maddox, I.S (2003). Exopolysaccharides from lactic acid bacteria, perspectives and challenges. *Trends Biotechnol*, 21(6): 269–274.
- Wessels, S., Huss, H.H. (1996). Suitability of *Lactococcus lactis* subsp *lactis* ATCC 11454 as a protective culture for lightly preserved fish products. *Food Microbiol*, 13(4): 323–332.
- Williams, S. T., Cross, T., (1971). Actinomycetes. In: *Methods in microbiology*. Booth C. Ed., Academic Press, London. 4: 295–334.
- Williams, S. T., Goodfellow, M., Alderson, G., Wellington, E.M.H., Sneath, P.H.A., Sackin, M.J. (1983). Numerical classification of *Streptomyces* and related genera. *J Gen Microbiol*, 129(6): 1743–1813.

- Williams, S. T., Locci, R., Beswick, A., Kurtboke, 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., and West, M. (1993). Detection and identification of novel actinomycetes. *Res Microbiol*, 144(8): 653–656.
- Williams, S.T., Davies, F.L. (1965). Use of antibiotics for selective isolation and enumeration of actinomycetes in soil. *J Gen Microbiol*, 38(2): 251–261.
- Williams, S.T., Lanning, S., Wellington, E.M.H. (1984). Ecology of Actinomycetes. In: *The Biology of the Actinomycetes*. Eds : M. Goodfellow, M. Mordarski and S.T. Williams. Academic press, London, New York, Sydney, Tokyo, Sao Paulo. 481–528.
- Williams, S.T., Wellington, E.M.H. (1982). Principales and problems of selective isolation of microbes. In: *Bioactive microbial products: Search and discovery*. Academic Press, London. 9–26.
- Wilson, K.A., Kalkum, M., Ottesen, J., Yuzenkova, J., Chait, B., Landick, R., Muir, T., Severinov, K., Darst, S. (2003). Structure of microcin J25, a peptide inhibitor of bacterial RNA polymerase, is a lassoed tail. *J Am Chem Soc*, 125(41): 12475–12483.
- Wong, J.H., Xia, L., Ng, T.B. (2007). A review of defensins of diverse origins. *Curr Protein Pept Sci*, 5(5): 446–59.
- Woodruff, W. A., Novak, J., Caufield, P. W. (1998). Sequence analysis of mutA and mutM genes involved in the biosynthesis of the lantibiotic mutacin II in *Streptococcus mutans*. *Gene*, 206 (1): 37–43.

Υ

- Yan, K.P., Li, Y., Zirah, S., Goulard, C., Knappe, T.A., Marahiel, M.A., Rebuffat, S. (2012). Dissecting the maturation steps of the lasso peptide microcin J25 in vitro. *ChemBiochem*, 13(7): 1046–1052.

Z

- Zacharof, M.P., Lovitt, R.W. (2012). Bacteriocins produced by lactic acid bacteria a Review Article. *APCBEE Procedia*, 2: 50–56.
- Zaitlin, B., Watson, S.B. (2006). Actinomycetes in relation to taste and odour in drinking water: Myths, tenets and truths. *Water Res*, 40(9): 1741–1753.
- Zaitlin, B., Watson, S.B., Ridal, J., Satchwill, T., Parkinson, D. (2003). Actinomycetes in lake Ontario: Habitats and geosmin and MIB production. *Res J Can*, 95 (2) : 113-118.
- Zermane, F. (2008). Etude des caractéristiques culturales des actinomycètes impliquées dans la biodégradation de la cellulose, des substances pectiques et des composés de synthèse. Magistère en Option Biotechnologies microbiennes. Université Mentouri Constantine. Algérie. 126 p.
- Zhang, Q., Yu, Y., Vélasquez, J.E., van der Donk, W.A. (2012). Evolution of lanthipeptide synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 109(45):18361–18366.
- 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 of two new suborders and four new families and emended descriptions of the existing higher taxa. *Int J Syst Evol Microbiol*, 59 (Pt 3): 589–608.
- Zinedine, A. (2004). Détermination des mycotoxines dans les aliments et étude de la réduction des aflatoxines par les bactéries lactiques isolées des ferments panaires traditionnels. Thèse de Doctorat en Microbiologie. Université Sidi Mohammed Ben Abdellah. Maroc. 162p.

Annexes

Annexe 1

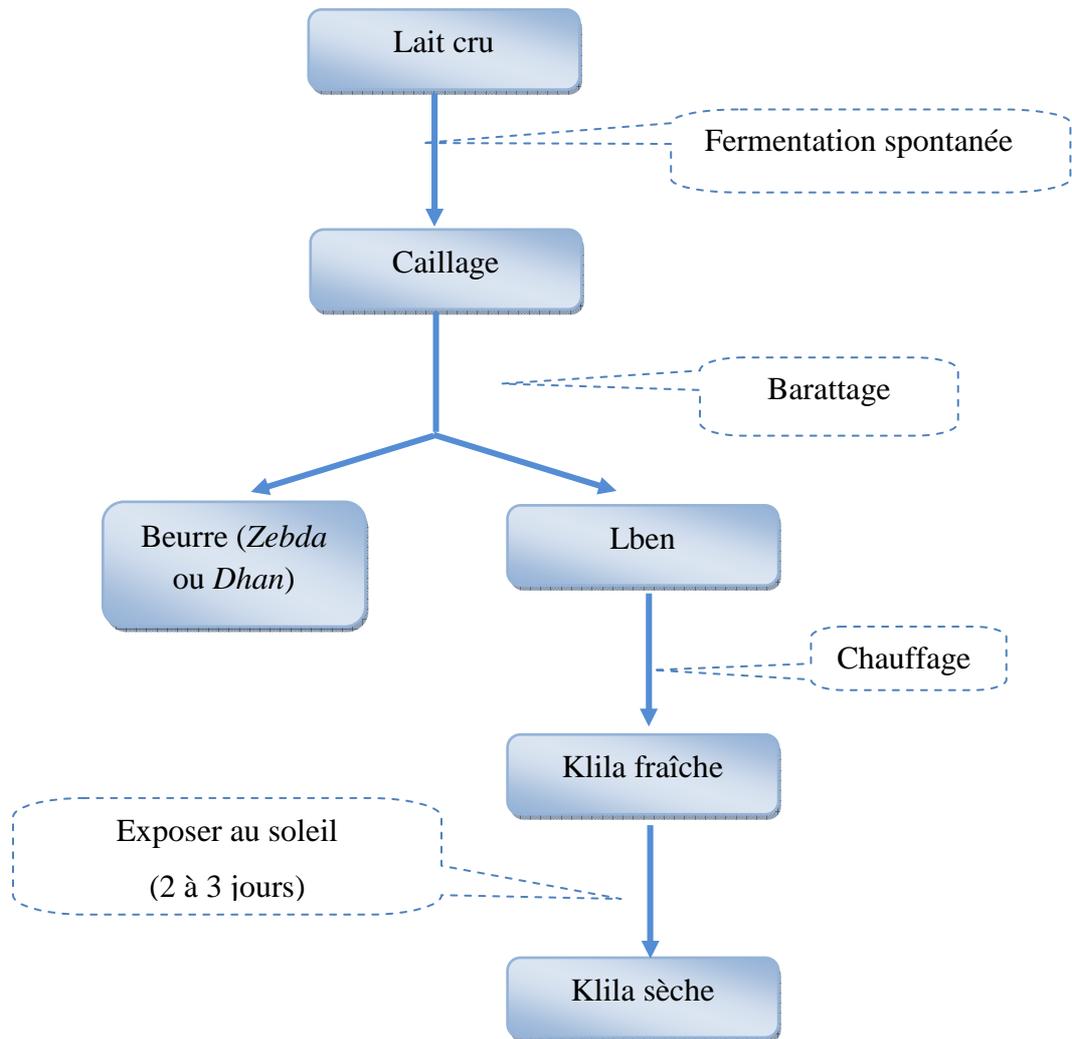


Diagramme 1 : Procédé de fabrication de Klila et de Zebda

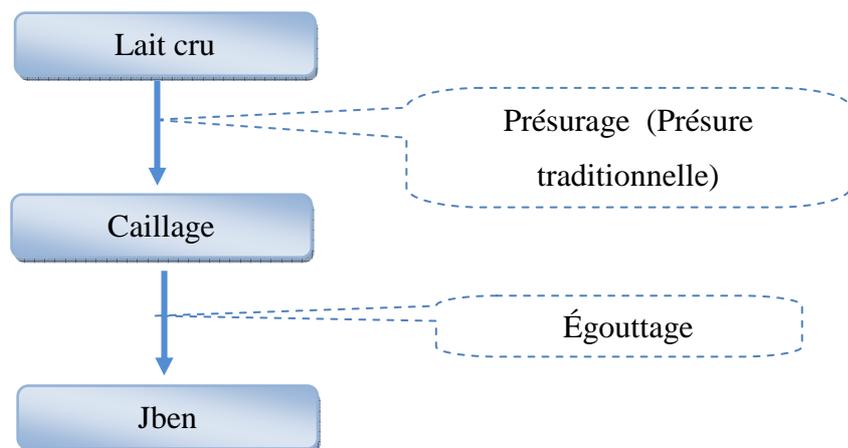


Diagramme 2 : Procédé de fabrication du Jben

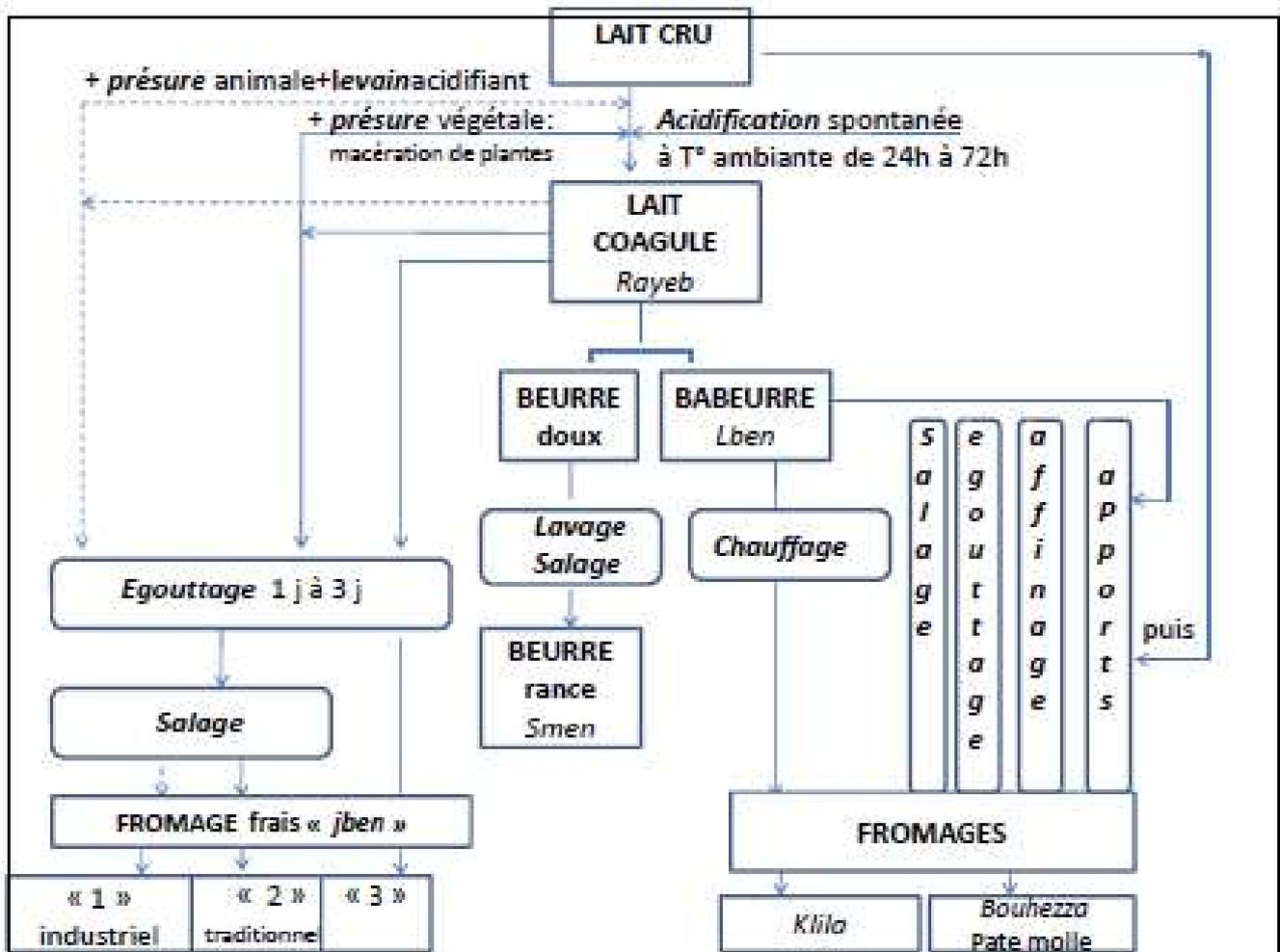


Figure 42 : Schéma des méthodes de fabrication des principaux produits laitiers algériens (modifié d'après Lahsaoui, 2009) (Bendimerad, 2013).

Annexe 2

Coloration de Gram

Un frottis fixé à la chaleur est coloré pendant une minute au *violet de cristal*; il est ensuite rincé rapidement à l'eau distillée, traité pendant une minute par une solution de *Lugol*, et de nouveau rincé rapidement à l'eau distillée. On soumet alors le frottis coloré à une étape de décoloration en le traitant avec l'éthanol 95%. Il s'agit de l'étape critique: la lame est maintenue inclinée et on fait couler le solvant sur le frottis pendant 15 à 30 secondes seulement jusqu'à ce que le colorant cesse de s'échapper librement du frottis. Celui-ci est alors immédiatement rincé à l'eau distillée. À ce stade les cellules Gram- seront incolores, les cellules Gram+ violettes. On soumet ensuite le frottis à une contre coloration de 10 à 30 secondes à la *fushine* (ou *safranine*) pour colorer les cellules Gram- présentes. Après un bref rinçage à l'eau distillée, on sèche le frottis au buvard ou au-dessus de la flamme d'un bec Bunsen et on l'examine à l'objectif (X 100) à immersion.

Avec cette coloration double, les bactéries « Gram-positif » apparaissent en violet foncé tandis que les bactéries « Gram-négatif » sont colorées en rose ou en rouge (**Delarras, 2007**).

Annexe 3

Identification biochimique par les Galerie API 50CH avec API 50 CHL medium (bioMérieux, Marcy l'étoile, France)

L'ensemencement et la lecture de la galerie ont été réalisés selon les instructions du fabricant. Ils se font de la façon suivante:

- Cultiver la souche pure sur milieu MRS gélosé 24h à $30\pm 1^{\circ}\text{C}$;
- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (2 ml), prélever toutes les bactéries de la culture, à l'aide d'un écouvillon, et réaliser une suspension dense (S) dans l'ampoule ;
- Ouvrir une ampoule d'API Suspension Medium (5ml) et réaliser une suspension d'opacité égale à 2 McFarland en transférant un certain nombre de gouttes de suspension (S) : noter ce nombre de gouttes (n) ;
- Ouvrir une ampoule de API 50 CHL Medium et inoculer avec 2 fois le nombre de gouttes trouvé (2n), homogénéiser ;
- Répartir API 50 CHL Medium ainsi inoculé dans les tubes seulement, et recouvrir les tests avec de l'huile de paraffine stérile ;
- Incuber à 30°C en aérobiose pendant 48h ($\pm 6\text{h}$) ;
- Tous les tests sont lus à 24h et 48h (on recherche dans chaque tube l'acidification produite qui se traduit par le virage au jaune du bromocrésol pourpre contenu dans le milieu. Pour le test esculine, on observe un virage du pourpre au noir) ;
- Noter les résultats sur la fiche des résultats ;
- Le profil biochimique ainsi obtenu peut être identifié à partir de la base de données, à l'aide du logiciel d'identification apiwebTM (bioMérieux, Marcy l'étoile, France).

Annexe 4

Quantification des acides nucléiques

Dosage UV

Rincer la cuve en quartz à EtOH
à H₂O d
à H₂O dd de dilution
mesure à λ fixe 260 et 280 nm
Faire le zéro avec 100 μ L d' H₂O dd de dilution
Dilution au 1/50 (2 μ L de plasmide + 98 μ L H₂O dd)

$$A_{260} = A_{260 \text{ mesure}} - A_{260 \text{ zéro}}$$

$$[\text{ADN}] = 50 \text{ (facteur de dilution)} \times (50 \times A_{260}) \text{ en } \mu\text{g/ml}$$

$$A_{260} / A_{280} = 2 \text{ ADN double brin}$$

>2 ARN
 <1.65 protéines

Gel d'Agarose

Gel à X% Xg d'agarose dans 100 ml de TAE 1X
Faire bouillir
couler le gel après avoir mis le scotch
mettre le peigne

dépôt : échantillon X μ L + H₂O dd qsp 5 μ L + 1 μ L LSB 6X
marqueur 0.5 μ L + 4.5 μ L H₂O dd + 1 μ L LSB 6X

faire migrer du – au + (ADN charge -) à 70 V (2-3 heures)

30 minutes dans du BET (15 μ L dans 300 mL H₂O d)
10 minutes dans H₂O d

Tampons

Tampon TAE 50X

242 g de Tris base
57.1 mL d'acide acétique glacial à 100%
100 ml EDTA 0.5 M, pH 8.0
H₂O qsp 1L

Tampon de charge 6X

0.25% bleu de bromophenol
0.25% xylene cyanol
25% saccharose
100 mM EDTA pH 8.0

Annexe 5**Composition des milieux de culture****Bennett**

Extrait de levure	1g
Extrait de viande	1g
Peptone pancréatique de caséine	2g
Glucose	10g
Agar	15g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

Bouillon nutritif

Peptone	10 g
Extrait de levure	5 g
NaCl	5 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

Bouillon Sabouraud

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Eau distillée	1000mL
pH	5,6

Citrate de Simmons

Ammonium dihydrogenophosphate	1g
Phosphate de dipotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Citrate de sodium	2g
Sulfate magnésium	0,2g
Bleu de bromothymol	0,08g
Agar	15g
Eau distillée	1000 mL
pH	6,8

Gélose nutritive

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

Gélose TSI (Triple Sugar Iron)

Peptone de viande	15g
Protéose peptone	5g
Extrait de viande	3g
Extrait de levure	3g
Glucose	1g
Saccharose	10g
Lactose	10g
Citrate de fer ammoniacal	0,3g
Chlorure de sodium	5g
Sodium thiosulfate	0,3g
Rouge de phénol	0,05g
Agar	18g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,2

ISP 6

Peptone	15 g
Protéose peptone	5 g
Citrate de fer ammoniacal	0,5 g
Phosphate dipotassique	1 g
Sodium thiosulfate	0,08 g
Extrait de levure	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000 ml
pH	7-7,2

Milieu LB (Luria-Bertani Medium)

Pour 1 litre :

A 950 mL d'eau distillée on ajoute :

- 10 g de bacto-tryptone
- 5 g extrait de levure
- 10 g NaCl

Mélanger jusqu'à dissolution des solutés, et ajuster le pH à 7.0 avec du NaOH 5 N. Ajuster le volume de la solution à litre avec de l'eau distillée, puis stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 120 °C.

M63

Le milieu chimiquement défini M63 (Miller, 1972) est composé de 13,6 g/L de KH_2PO_4 , 2 g/L de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 250 mg/L de $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg/L de thiamine-HCl et 0,5 mg/L de $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$. Le pH est ajusté à la valeur de 7,3 avec une solution de KOH. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 30 min à 0,5 bar puis du glucose stérile est ajouté à la concentration finale de 4 g/L.

Milieu Minimum M63 : KH_2PO_4 100 mM, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 15 mM pH 7, supplémenté par du glucose 0.2 %, MgSO_4 0,02 %, thiamine 1 mg/L et 1 g/L d'hydrolysats tryptiques d'acide aminés (Difco) ou d'hydrolysats acide de caséine (Difco).

M 72 (Gélose Trypto-caséine soja)

Tryptone	15 g
Peptone papainique de soja	5 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar agar bactériologique	15 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,3±0,2

MRS

Le milieu MRS (milieu de de Man, Rogosa et Sharpe, de Man *et al.*, 1960) est composé de 10 g/L de peptone de protéose n°3, de 10 g/L d'extrait de boeuf, de 5 g/L d'extrait de levure, de 20 g/L de glucose, de 1 g/L de polysorbate 80, de 2 g/L de citrate d'ammonium, de 5 g/L d'acétate de sodium, de 0,1 g/L de sulfate de magnésium, de 0,05 g/L de sulfate de manganèse et de 2 g/L de phosphate dipotassique. Le pH final de ce milieu est de 6,5. Le milieu est ensuite stérilisé par autoclavage durant 15 min à 1 bar.

Mueller Hinton

infusion de viande de bœuf	2 g
Amidon	15 g
Hydrolysate de caséine	17,5g
Agar	17 g
Eau distillée	1000 mL
pH	7,3

Sabouraud

Peptone de gélatine	10g
Glucose	20g
Agar	17g
Eau distillée	1000 mL
pH	17g

Soyabean Flour Medium (SFM)

Extrait de levure	5g
Farine de soja	5g
K ₂ HPO ₄	5g
NaCl	5g
Glycerol	20g
Eau distillée	1000mL
pH	6,8 (ajuster avec 5N HCl)

TSA (Gélose Trypticase de soja)

Trypticase	17 g
Soytone	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Agar	15 g
Eau distillée	1000ML
pH	7,2

Milieu TSB (Bouillon Trypto-Caséine Soja)

NaCl	5 g
KH ₂ PO ₄	2,5 g
Glucose	2,5 g
Peptone de caséine	17 g
Peptone de farine de soja	3 g
Eau distillée	1000mL
pH	7,3

Urée- indole

L-tryptophane	3g
Phosphate de dipotassique	1g
Phosphate monopotassique	1g
Chlorure de sodium	5g
Urée	20g
Rouge de phénol	2,5g
Eau distillée	1000 ml
pH	6,8

Annexe 6

Tableau 39 : Résultats de l'antibiogramme de certaines souches d'actinomycètes avec des diamètres de zone d'inhibition en (mm)

ATB Souche	Erythromycine (E)	Ampicilline (AM)	Acide nalidixique (NA)	Tétracycline (TE)	Pénicilline (P)	Amoxicilline (AMX)
511	13 (R)	0 (R)	0 (R)	19 (S)	0 (R)	0 (R)
512	10 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
480	07 (R)	0 (R)	0 (R)	08 (R)	0 (R)	0 (R)
493	16 (R)	0 (R)	0 (R)	09 (R)	0 (R)	0 (R)
479	14 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)	0 (R)
476	9 (R)	0 (R)	0 (R)	14 (R)	0 (R)	0 (R)
509	11 (R)	0 (R)	0 (R)	08 (R)	0 (R)	0 (R)
506	22 (S)	0 (R)	0 (R)	24 (S)	0 (R)	0 (R)
505	21 (I)	08 (R)	0 (R)	19 (S)	0 (R)	0 (R)

S : Sensible, **R** : Résistante et **I** : Intermédiaire.

Annexe 7

Tableau 40 : Résultats de l'identification de quelques bactéries lactiques par API 50CHL.

Souche	439	440	441	442	443	444	446	455	456	457	458	453	454	459	452	448	449	437
0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GLY	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	(+/-)	+	-	+	-
ERY	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARA	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARA	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+
RIB	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	(+/-)
DXYL	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
LXYL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ADO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+/-)	+	(+/-)
GLU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+/-)	+	-
FRU	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+/-)	+	(+/-)
MNE	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(+/-)
SBE	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RHA	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	(+/-)	-
DUL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
INO	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-
MAN	+	+	+	+	+	(+/-)	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
SOR	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
MDM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MDG	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	(+/-)
NAG	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+/-)	+	(+/-)
AMY	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	(+/-)	+	-
ARB	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
ESC	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	(+/-)	+	-
SAL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	(+/-)	+	-
CEL	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	(+/-)	+	-
MAL	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+
LAC	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	(+/-)
MEL	-	-	-	-	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-	-	(+/-)	+	-	-	+	-	(+/-)	-	+
SAC	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	(+/-)	(+/-)	(+/-)	+
TRE	+	+	+	+	+	(+/-)	+	+	+	+	+	+	+	+	(+/-)	-	(+/-)	+
INU	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
MLZ	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
RAF	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)
AMD	(+/-)	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	(+/-)	-	-	-
GLYG	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
XLT	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+/-)	-	-
GEN	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	+	+	-	+	-
TUR	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+
LYX	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
TAG	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-
DFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LFUC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LARL	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
GNT	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	(+/-)	-	-	-	-	+	-	-	(+/-)	-	+	(+/-)
2KG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SKG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Communications & Publications

COMMUNICATIONS SCIENTIFIQUES

• **Communications internationales :**

BELYAGOUBI Larbi, ABDELOUAHID Djamel Eddine, DJOUMI Fatima Zohra et ATTALAH Abderrazak (2008). Activité anti-*Listeria* des bactéries lactiques isolées du lait cru, Séminaire international "Biologie et santé", 15-16 Avril 2008, Tlemcen.

BELYAGOUBI Larbi, ZIRAH Séverine, LI Yanyan, ABDELOUAHID Djamel Eddine, REBUFFAT Sylvie (2010). Screening of Antimicrobial Peptides in Actinomycetes. Journées Streptomyces, 27-28 mai 2010, Paris, France.

BELYAGOUBI Larbi, ABDELOUAHID Djamel Eddine, ZIRAH Séverine, LI Yanyan et REBUFFAT Sylvie. Antimicrobial peptides produced by actinomycetes from ecosystems of Algeria. Molecular identification of microorganisms and preliminary characterization of their biological activity. The 3rd International Workshop on Industrial Biotechnology (IWIB 2012), 23rd to 24th, April 2012 at Sfax - Tunisia.

• **Communications nationales :**

BELYAGOUBI Larbi, ABDELOUAHID Djamel Eddine, DJOUMI Fatima Zohra et ATTALAH Abderrazak (2006). Essais d'étude d'effet antagoniste de bactéries lactiques sur quelques souches de *Listeria* isolées de lait cru. 1^{ères} Journées de Biotechnologie au Service des Industries alimentaires, 11-12 novembre 2006, Constantine.

BELYAGOUBI Larbi, CHAIBI Rachid, GAOUI Halima et SOUIDA Khadra (2012). Étude du Pouvoir Antimicrobien des Bactéries Lactiques Isolées des Produits Laitiers Traditionnels du Sud Algérien. Forum Scientifique sur Science de la Nature, 14-16 Mai 2012, Tlemcen.

PUBLICATION INTERNATIONALE

BELYAGOUBI Larbi et ABDELOUAHID Djamel Eddine (2013). Isolation, identification and antibacterial activity of lactic acid bacteria from traditional algerian dairy products. *Advances in Food Sciences*, 35 (2) : 82 – 90.

ISOLATION, IDENTIFICATION AND ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF LACTIC ACID BACTERIA FROM TRADITIONAL ALGERIAN DAIRY PRODUCTS

Larbi Belyagoubi^{1*} and Djamel Eddine Abdelouahid²

¹ Laboratoire des Produits Naturels, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algeria

² Laboratoire de Microbiologie Appliquée à l'Agro-alimentaire, au biomédical et à l'Environnement, Département de Biologie, Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Sciences de la Terre et de l'Univers, Université Abou Bekr Belkaïd, Tlemcen, Algeria

ABSTRACT

This study gives information about Algerian milk which is also transformed into traditional dairy products, such as *Jben*, *Zebda*, *Dhan* and *Klila*, constituting an indispensable part of Algerian daily life, and being a generous lactic acid bacteria (LAB) resource with inhibitory activity against pathogenic germs. Eight samples of traditional dairy products were collected from four different regions of Algeria and used as sources for the isolation of LAB. A total of 21 gram-positive and catalase-negative isolates were obtained on the media M17 and MRS at incubation temperatures of 28 and 45 °C. The strains were identified using a combination of phenotypic and genotypic methods including 16S rRNA gene sequencing and carbohydrate assimilation profiling with API 50 CH identification system. The results revealed that the microflora was dominated by LAB belonging to the genera *Enterococcus* (65%), *Leuconostoc* (21%), *Lactobacillus* (2 strains), *Lactococcus* (1 strain), and *Weissella* (1 strain). The diameters of inhibition zones of examined pathogenic bacteria (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* ATCC 9341, *Listeria monocytogenes* ATCC 19111, *Bacillus cereus* ATCC 25921, *Escherichia coli* ATCC 8739 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853) varied between 04 and 37 mm. A wide variety of LAB from traditional Algerian dairy products showing potentially important antimicrobial activity could be used for preventing the development of human pathogens in foods and used as starter cultures.

KEYWORDS: Algeria, traditional dairy products, lactic acid bacteria (LAB), antibacterial activity

1 INTRODUCTION

In Algeria, the milk market is dominated by three kinds of products, namely, pasteurised reconstituted milk in small 1-L bags with 24-h shelf-life, fresh milk sold directly to consumers from the farm with higher prices, and UHT in tetra-pack boxes sold by some private processors, but whole milk powder is also imported in small boxes of 500 g for direct sale to consumers (report of Ministry of Agriculture). But this study is dealing with different Algerian raw milks (cow, ewe, buffalo, sheep, goat and camel) are consumed as they are, or transformed into dairy products. The nomads extract some fat content in the form of butter (*Zebda* or *Dhan*), and the casein in the form of fresh cheese (*Jben* or *Klila*), or hard cheese (*Klila*) for long-term storage. Indigenous fermented foods are strongly linked to Algerian culture and tradition. As effective preservation methods were not commonly available in ancient times, food fermentation played an important role in preserving food quality. Traditional recipes were handed over from one generation to another, forming a unique and diverse Algerian food fermentation culture. Fermentation adds safety, nutritional value and different flavours to what could have otherwise been a bland diet [1]. As Algeria is a multi-ethnic country with nomadic people, abundant resources of fermented or non-fermented dairy products have been developed. The ancestors of current nomadic people acquired the knowledge of domestic livestock milk fermenting and left a precious asset in Algerian food culture [1].

LAB have been likely the prime agents in producing soured (fermented) milk and dairy products. They are naturally present in the udder, the raw milk of healthy animals, and have spread in the dairy environment [2]. LAB are the biological basis for the production of a great multitude of fermented foods [3]. The most important contribution of these bacteria to fermented products is to preserve the nutritive qualities of the raw material and inhibit the growth of spoilage and pathogenic bacteria [4]. LAB constitute a large group of non-sporulating Gram-positive, catalase and oxidizing negative rods as well as cocci that produce lactic acid as the major metabolite of the carbohydrate fermen-

tation. LAB are anaero-aero-tolerant, and generally have complex nutritional requirements, especially for amino acids and vitamins. The LAB genera comprise *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus* as well as the more peripheral *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Oenococcus*, *Sporolactobacillus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Weissella* and *Bifidobacterium* [5]. LAB are used as natural or selected starters in food fermentations in which they perform acidification due to production of lactic and acetic acid flavour. Protection of food from spoilage and pathogenic microorganisms by LAB is through producing antimicrobial substances, such as organic acids, hydrogen peroxide, or diacetyl [6], antifungal compounds, such as fatty acids [7], or phenyllactic acid [8], and/or bacteriocins [9]. LAB play an important role in food fermentation as the obtained products are characterized by hygienic safety, storage stability, and

attractive sensory properties [10]. Today, LAB are a focus of intensive international research for their essential role in most fermented food, for their ability to produce various antimicrobial compounds promoting probiotic properties [11], including antitumoral activity [12, 13], reduction of serum cholesterol [14, 15], alleviation of lactose intolerance [16], stimulation of the immune system [17], and stabilization of gut microflora [18]. Consumption of fermented foods has many advantages including enhanced nutritional value, digestibility, therapeutic benefits, and safety against pathogens.

The quality of these products is strictly dependent on the microbial associations responsible for the fermentation, and the biodiversity of LAB involved is considered to be a fundamental factor for the maintenance of the characteristic features [19]. The preparation of the product

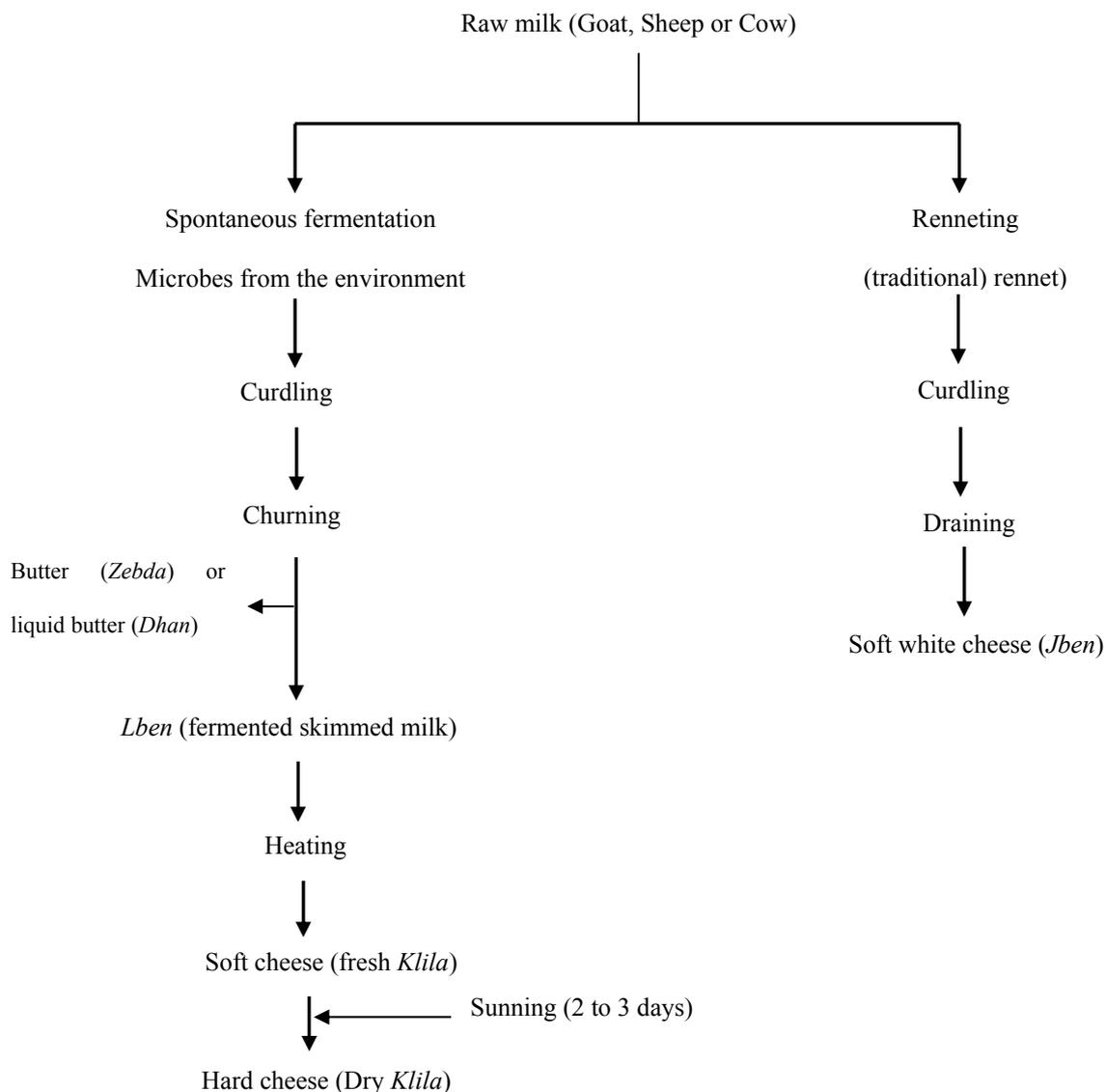


FIGURE 1 - Schematic illustration of the manufacture of traditional Algerian dairy products.

is a traditional family art, and an overview of the production of traditional Algerian dairy products is shown in Fig. 1. Although studies related to dairy products in Algeria have been published, only a few microbiological studies have been carried out on traditional butters *Shmen*, *Dhan* and *Jben* [20-22]. The aim of this work was, firstly, to isolate and identify LAB from different traditional dairy product samples. On the other hand, it was to select interesting strains of LAB with antibacterial activity, and how they can be used in the future work to improve Algerian dairy products with characterization of antimicrobial metabolites.

2 MATERIALS AND METHODS

2.1 Sample collection and isolation of LAB

Artisanal dairy samples produced traditionally with different formulations in four different cities of Algeria were collected from June to December 2008 (Table 1), and from the final product. Sampling was carried out under aseptic conditions using sterile plastic or glass bottles. Except for the *Klila*, the samples were kept refrigerated at 5 °C until arrival in the laboratory for microbiological analysis. Plate count agar (PCA) was used for mesophilic aerobic counts [23]. For isolation and counting of lactic acid bacterial cells, 10 g of each dairy product was homogenized aseptically with 90 ml of sterile physiological saline (0.85%, w/v, Merck, Germany), and then, bacteriological peptone (0.1%, w/v, Merck, Germany) was added to obtain a 1:10 dilution, which was mixed completely. Sequential decimal dilutions of the homogenate were made successively afterwards, and 0.1 ml of the appropriate decimal dilutions were plated onto MRS (De Man, Rogosa and Sharpe) agar [24], M17 agar [25] (Fluka, Germany), and M17 agar acidified to pH 5.5 for the isolation of thermophilic LAB. The plates were incubated anaerobically at 28 and 45 °C for 3 days. The colonies were randomly picked from plates with 30–300 colonies, and several representative strains displaying the general characteristics of LAB were chosen from each plate for further studies. Bacterial colonies that developed on the plates were individually picked and put onto fresh MRS agar plates by dilution-streaking to obtain single colonies. This procedure was repeated in order to purify the isolates, which were maintained on MRS broth (Oxoid, Australia) containing 20% (v/v) glycerol before being subjected to molecular analysis.

The presumptive identification of the microorganisms belonging to the LAB group was performed by Gram stain phenotype, cellular morphology and catalase reaction, followed by microscopy [26]. Four strains with the highest levels of inhibitory activity were selected and phenotypically identified by their sugar fermentation characteristics using API 50 CHL kits (BioMérieux, Marcy l'Etoile, France), according to the manufacturer's instructions, and the results were read after incubation at 30 °C for 24 h and 48 h. All results obtained by API were found between good and excellent identification. In addition, 16 S rRNA gene of bacterium with high antagonistic activity was sequenced.

2.2 Determination of pH

Potentiometric pH measurements were obtained with the pin electrode of a pH-meter that was inserted directly into each soft sample. Concerning the hard samples, 10 g of sample was homogenized with 20 ml of distilled water in a stomacher bag mixer for 30 s, and the pH of the homogenate was determined using a digital pH-meter (Adwa instruments AD1030) calibrated with standard buffer solutions [27].

2.3 Screening for antagonistic activity

LAB strains were isolated from single colonies and tested for inhibitory effects on four Gram-positive (*Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Micrococcus luteus* (CIP 53.45/ATCC 9341), *Listeria monocytogenes* ATCC 19111 and *Bacillus cereus* ATCC 25921) and against two Gram-negative bacteria (*Escherichia coli* (CIP 53.126/ATCC 8739) and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853). Antagonistic activity was examined as described by method of [28], with some modifications. Tested LAB strains were spot-inoculated onto the MRS agar (1.2 % bacteriological agar and 0.2 % glucose) and incubated at 28 °C for 48 h to allow producer colonies to develop. After the formation of colonies, these agar plates were overlaid with 10 ml of semi-hard MRS agar (0.7% bacteriological agar, and 0.2 % glucose) maintained at 45 °C and containing a set of 3 indicators (approx. 10⁷ cfu/ml of each strain), and the resultants mixtures were incubated at 37 °C for 18–24 h. Culture medium used for indicator strains was nutrient broth. The diameter of the inhibition zone around the colony of LAB was measured, and the results were expressed in mm.

TABLE 1 - Regions and sampling of traditional dairy products.

Code	Sampling region	Dairy product	Matter of production
S ₁	Adrar (Arid region)	Traditional butter (<i>Zebda</i>)	Ewe's milk
S ₂	Laghouat (Semi-arid region)	Traditional liquid butter (<i>Dhan</i>)	Cow's milk
S ₃	Laghouat (Semi-arid region)	Traditional liquid butter (<i>Dhan</i>)	Ewe's milk
S ₄	Laghouat (Semi-arid region)	Hard cheese (<i>Klila</i>)	Ewe's milk
S ₅	El-Bayadh (Arid region)	Hard cheese (<i>Klila</i>)	Ewe's milk
S ₆	Mecheria (Semi-arid region)	Soft cheese (<i>Klila</i>)	Cow's milk
S ₇	Mecheria (Semi-arid region)	Soft white cheese (<i>Jben</i>)	Cow's milk
S ₈	Mecheria (Semi-arid region)	Traditional butter (<i>Zebda</i>)	Cow's milk

2.4 Characterization of LAB with antimicrobial properties

Selected strains were cultured overnight at 30 °C, and then harvested by centrifugation (8000g for 10 min at 4 °C) to pellet the cells. DNA concentration and quality were assessed by measuring optical density at 260 and 280 nm with a spectrophotometer (Uvikon 9x3 w; Bioserv). Amplification of 16s rRNA genes of selected LAB was carried out using universal reverse primers 1385 R (CGG TGT GTR CAA GGC CC) and coupled with forward primer 27 F (GAG TTT GAT CCT GGC TCAG). DNA was amplified in 50 µl volumes containing 10 µl (2 ng/ µl) template DNA, 1X Taq DNA polymerase buffer (Qbiogen Promega), 20 µM of each dNTP (Eurogentec Promega), 10 µM of each primer (forward and reverse), 1 UE Taq DNA polymerase (Promega), and Milli-Q water. An initial denaturation at 94 °C for 5 min was followed by 32 cycles of denaturation for 30 s at 94 °C, annealing for 30 s at 55 °C, and elongation at 72 °C for 1 min, and a final extension at 72 °C for 5 min, on a Mastercycler Personal (Eppendorf). Amplicons were separated on a 0.7% (w/v) agarose (Qbiogene) gel stained with ethidium bromide (0.8 µg.ml⁻¹) using an electrophoretic migration of 90 V for 25 min. They were visualized with a UV transilluminator ($\lambda = 254$ nm), and gel images were captured and analyzed with Gel Capture USB2 (VWR). Molecular weight markers were 1 kb DNA Ladder (0.5-10 kb, New England Biolabs). Sequences were aligned using basic local alignment search tool (BLAST; GenBank database, 2010) to determine the most related sequence relatives in the NCBI nucleotide sequence database <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>. The phylogenetic tree was constructed by using the neighbour-joining method [29], which is available at <http://www.phylogeny.fr/>.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Enumeration of microorganisms

Table 1 summarizes the microbial counts obtained from traditional dairy products from Algeria with pH values of samples. The pH of the 8 samples ranged from 4.00 to 6.00, with an average of 4.70. The aerobic, mesophilic and lactic acid bacteria were enumerated by using three different media at 2 different temperatures (Table 1). Men-

nane *et al.* [30] reported that LAB are by far the major microbial group in *Klila* products, and the results show that the average counts of aerobic mesophilic flora were 2.2×10^6 , $8,64 \times 10^3$, 1.2×10^4 , 4.4×10^4 and 3.50×10^4 cfu.g⁻¹ of dry *Klila* 1, *Klila* 2, *Klila* 3, *Jben* 1 and *Jeben* 2 samples, respectively. The predominance of LAB in dairy products is a reassuring factor and has a long and safe history of use as preservatives, especially in cheese making [31]. Except for *Dhan* (sample 3) and *Klila* (sample 5), the mean counts on MRS agar (28 °C) and M17 agar were higher than the mean total plate counts on PCA, indicating the predominance of LAB. The mean count of thermophilic bacteria (45 °C) on MRS agar and M17 was less than the mean mesophilic count on PCA (28 °C). This observation is in accordance with results reported by other authors from traditional Algerian butter “Shmen” [22], and Fulani traditional Burkina Faso fermented milk [32]. Also, in a previous study, Gaoui and Souida (2009) [33] reported the dominance of mesophilic microflora of *Zebda*, *Klila* and *Jben* manufactured by goat's milk from Laghouat where the average LAB counts at 30 °C ranged between 6.5×10^2 and 5.8×10^9 cfu g⁻¹ on MRS and M17. The lowest LAB counts were recorded at “*Dhan*” (sample 2) and “*Zebda*” (sample 8) manufactured with the cow's milk. This study revealed that the species composition of the native LAB population in traditional dairy products varied among products from different regions and the origin of the milk. It has been demonstrated that the breed has a significant impact on the concentrations of the various constituents of milk, and the bibliography showed the primordial influence on renneting properties of certain physico-chemical characteristics in milk [34]. These differences in milk composition may have an effect on the microbiology of milk [35]. Terzaghi, and Sandine [36] reported that the average count of total bacteria, obtained from Azerbaijani traditionally manufactured dairy products (Agdas and Sheki cheeses) were ranged between 2.01×10^7 and 1.03×10^8 cfu g⁻¹ on MRS, 1.74×10^7 and 4.16×10^7 cfu g⁻¹ on GM17 agar plates. Two other studies [37, 38] also reported that LAB counts of Moroccan *Jben* were present in total counts of 10^8 – 10^9 cfu g⁻¹. These results are slightly high compared with those herein reflecting that LAB counts changes depend on the sample, fermentation time and conditions, isolation media and incubation temperature used.

TABLE 2 - The pH and total viable counts (cfu.g⁻¹) of different bacteria obtained from traditional dairy products.

Product	pH	Counts (cfu/g)				
		MRS _{28°C}	M17 _{28°C}	MRS _{45°C}	M17 _{45°C}	PCA _{30°C}
S ₁ : <i>Zebda</i>	4.55 ^a	10 ^{6b}	10 ⁶	5x10 ⁴	2.4x10 ⁵	2.2x10 ²
S ₂ : <i>Dhan</i>	4.71	6x10 ²	8x10 ²	2x10 ²	4x10 ²	4x10 ⁷
S ₃ : <i>Dhan</i>	5.03	2x10 ⁴	3x10 ⁴	2.4x10 ⁴	2.7x10 ⁴	1.8x10 ⁸
S ₄ : <i>Klila</i>	3.92	10 ⁹	9 x10 ⁸	1.1 x10 ³	3.6 x 10 ³	3x10 ³
S ₅ : <i>Klila</i>	4.02	10 ⁴	10 ³	2x10 ²	2.9 x10 ³	1x10 ⁸
S ₆ : <i>Klila</i>	4.43	3.15x10 ⁸	3.18x10 ⁸	10 ⁵	7x10 ⁶	5.09x10 ⁷
S ₇ : <i>Jben</i>	6.38	3.4x10 ⁷	5x10 ⁷	2.9 x10 ⁷	4.6x10 ⁷	3.47x10 ⁷
S ₈ : <i>Zebda</i>	4.71	10 ²	5x10 ²	10 ²	10 ²	3x10 ¹

^{a, b} The pH and the cfu/g correspond to an average number.

3.2 Identification of LAB and phylogenetic relationships

Several colony morphologies could be observed on most of the agar plates. A total of 20 representative LAB isolates showing different characteristics (colour, shape, etc.) were randomly collected from 8 dairy products and purified. Most of them were isolated from M17 agar, followed by MRS agar. The identification based on biochemical tests, or even by the API system, led sometimes to false results, or sometimes did not allow for identification of the strain [39]. Strains were shown to produce high inhibition zones against indicators selected for identification by API 50CHL and sequencing of the 16S rRNA gene. High similarities between the isolates were obtained during the present study, and sequences deposited in Genbank were found (98-100%). Beukes *et al.* [40] reported that 5 LAB genera (*Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Leuconostoc*, *Lactococcus*) were found in traditionally fermented South African milk. From the isolates of LAB classified on the basis of the phenotypical and/or genotypical tests, the species names of 20 strains were as follows: *Enterococcus faecalis* (8 strains), *Enterococcus durans* (3 strains), *Enterococcus faecium* (2 strains), *Leuconostoc mesenteroides* (3 strains), *Lactobacillus plantarum* (2 strains), *Weissella paramesenteroides* (1 strain), and *Lactococcus lactis* (1 strain) (Fig. 2). Similar results have been reported with Moroccan traditional fermented dairy products like *Jben*, whereas the dominant genera isolated were *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc* and

Enterococcus, respectively [41]. Similarly, some researchers found that the isolated strains from samples of dried *El-Klila* belonged to *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus confuses*, *Streptococcus* sp., *Pediococcus* sp., *Pediococcus acidilactici*, *Lactobacillus* sp., *Streptococcus* sp. and *Leuconostoc* sp. [20]. These findings help to explain the various typical sensory profiles of traditional dairy products from different regions of Algeria, and offer the possibility of a standardized use of these organisms as starters after improving their technological properties for the preparation of dairy products. It was reported that LAB represented by *L. lactis* ssp. *cremoris*, *L. lactis* ssp. *lactis* biovar *diacetylactis*, *E. faecium*, *L. plantarum*, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *L. paracasei* ssp. *paracasei*, *Ln. pseudomesenteroides* and *Ln. gelidum* can be isolated from traditional Algerian butter 'shmen', and enterococci represent an important part of the bacterial microflora of *shmen* [22]. This group of bacteria plays a major role in the ripening and aroma development of butter and many types of traditional cheeses [42]. However, in the study of [43], among 266 isolated strains from traditional fermented milk *Dahi* in Bangladesh, 134 belonged to the genus *Streptococcus* (50%), 72 to *Lactobacillus* (27%), 25 to *Enterococcus* (9%), 13 to *Leuconostoc* (5%), 12 to *Lactococcus* (5%), and 10 to *Pediococcus* (4%). The factors that modulate this distribution could be the product formulation, processing methods and practices, etc., which vary significantly across different regions of the

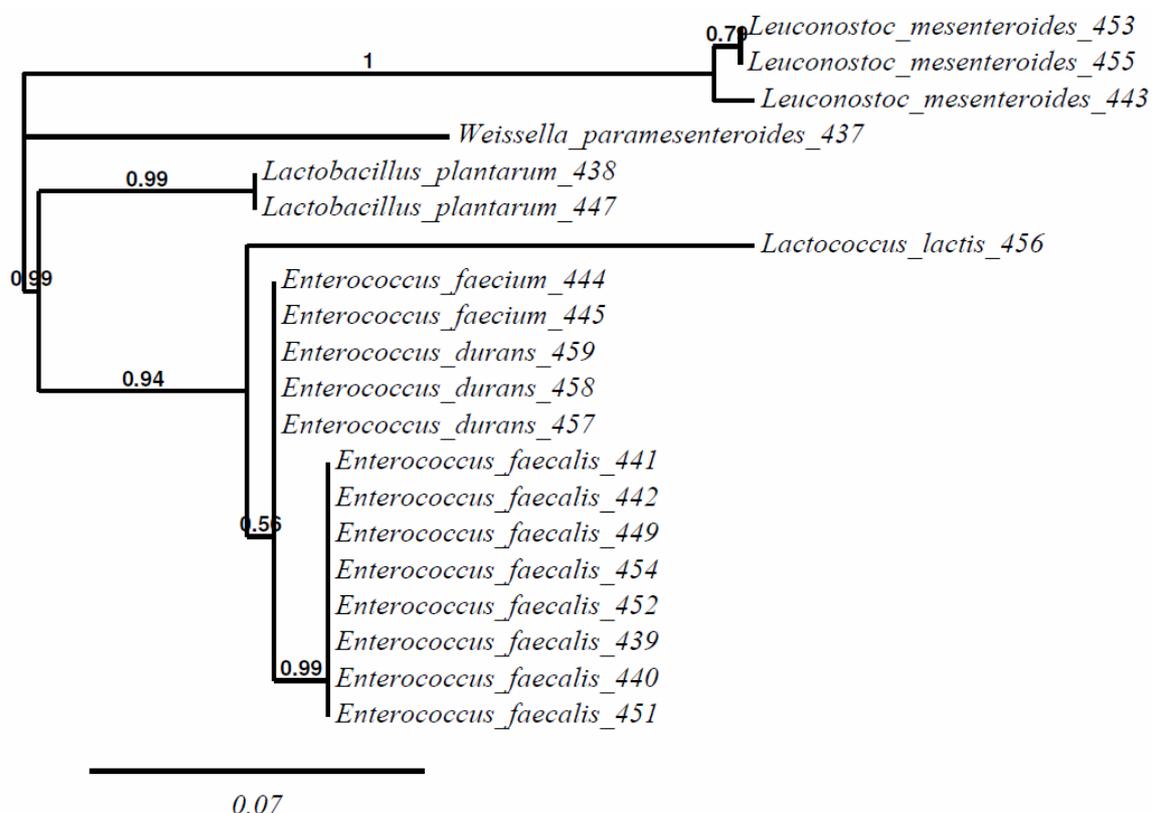


FIGURE 2 - Phylogenetic relationships of representative strains of LAB isolated from traditional Algerian dairy products based on partial 16S rRNA gene sequences.

TABLE 3 - Inhibitory effects of isolated lactic acid bacteria on indicator microorganisms.

Isolate	Origin	Test strain					
		<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 9341	<i>Listeria monocytogenes</i> ATCC 19111	<i>Bacillus cereus</i> ATCC 25921	<i>Escherichia coli</i> ATCC 8739	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853
437	Dhan (S ₃)	08 ^a	08	06	10	14	15
438	Dhan (S ₃)	20	15	11	13	23	30
439	Dhan (S ₂)	04	06	07	00	16	12
440	Dhan (S ₂)	10	07,5	07	06,5	15	34
441	Dhan (S ₂)	08,5	11	05	06	11	09
442	Dhan (S ₂)	03	09	04	03	05	03
443	Zebda (S ₁)	08	15	14	10	24	07
444	Zebda (S ₁)	10	21	11	17	16	15
445	Zebda (S ₁)	35	14	16,5	34	20	36
447	Zebda (S ₁)	17	14	13	08	11,5	23
449	Zebda (S ₈)	10	12	06	18	07,5	13,5
451	Klila (S ₆)	09	08	10	19	05	22,5
452	Klila (S ₆)	09	04,5	00	00	19	00
453	Klila (S ₆)	09,5	09	05,5	13	09	24
454	Jben (S ₇)	09,5	14	08,5	09	09	36,7
555	Jben (S ₇)	08	24	00	04	05,5	00
456	Jben (S ₇)	10,5	08,5	08	05	01	16
457	Jben (S ₇)	08,5	15	09	09	09	26
458	Jben (S ₇)	07	21	07	07	05	20,5
459	Jben (S ₇)	07	10	08	05	03,5	32

^a Activity measured by diameter of inhibition zones (in mm). Values presented are the means of two independent experiments by duplicate.

country. Earliest investigation has reported that traditional fermented milks in regions with a cold climate contain mesophilic bacteria, such as *Lactococcus* and *Leuconostoc* spp. whereas, in warm regions, thermophilic bacteria like *Lactobacillus* and *Streptococcus* prevailed. Thus, the dominance of mesophilic bacteria in some samples could be explained by the fact that our samples were collected during the cooler months in some region of Algeria (September, November, December for samples 3, 5 and 6, respectively), and the ambient temperatures at which natural fermentation probably took place. This result supports the theory that traditionally fermented milks depend on the microorganisms found in a particular climatic region. The distribution of LAB depended on nature of fermented milk or fermented food [32]. The 16S rDNA sequence data were aligned to construct a phylogenetic tree (Fig. 2) showing a random distribution of LAB species isolated from traditional Algerian dairy products. Furthermore, our findings demonstrated that some LAB (*Enterococcus* sp.) species isolated are different from those commonly associated.

3.3 In vitro assessment of antimicrobial effect of LAB

Screening for antagonistic activity demonstrated that LAB originally isolated from Algerian dairy products are probably the best candidates for improving the microbiological safety of these foods, because they are well adapted to the conditions in these kinds of foods and should, therefore, be more competitive than LAB from other sources. The antimicrobial activity of LAB may be due to the production of organic acids, with a consequent reduction in pH, or to the production of hydrogen peroxide. It may also be due to the production of bacteriocins or bacteriocin-like compounds [44]. *In vitro* assessment of antimicrobial effects of the LAB to inhibit the growth of microorganism indicators *in vitro* was evaluated, and the results are shown in Table 3. Wild bacterial strains need to withstand the competition of other microorganisms to survive in their hostile natural environment, so they often produce antimicrobials [45]. The potential of starter cultures to produce antimicrobial compounds has attracted much attention as they can be used to prevent food spoilage and to inhibit growth of food pathogens, especially in dairy products which are consumed without any heat treatment. Culture LAB isolates were effectively used because of their antimicrobial activity against 6 Gram-positive and Gram-negative indicator strains grown in culture media with clearing zones fluctuating between 04 and 37 mm. These values were consistently higher than those reported in previous studies [33]. Accordingly, the antimicrobial effects of the LAB might be fundamentally attributed to cause cell death rather than growth inhibition. Previous findings [46] have also shown that some bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains, although able to inhibit a variety of pathogenic bacteria, do not inhibit the growth of both *Salmonella* sp. and *Vibrio cholerae* when the effect of acid was excluded. The bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711 from Tenerife cheese was active against Gram-negative bacteria, such as *Shigella sonnei* and *Klebsiella pneumoniae* [47]. Previously, a broad spectrum of substances from *Lactobacillus reuteri* with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria was found [48]. Generally, the strains isolated from Dhan and Zebda were highly capable to inhibit pathogen indicators. Antimicrobial activity is a desirable trait in both starter cultures and probiotic bacteria. Strains of different species of *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus parvulus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from brines

microbial effects of the LAB to inhibit the growth of microorganism indicators *in vitro* was evaluated, and the results are shown in Table 3. Wild bacterial strains need to withstand the competition of other microorganisms to survive in their hostile natural environment, so they often produce antimicrobials [45]. The potential of starter cultures to produce antimicrobial compounds has attracted much attention as they can be used to prevent food spoilage and to inhibit growth of food pathogens, especially in dairy products which are consumed without any heat treatment. Culture LAB isolates were effectively used because of their antimicrobial activity against 6 Gram-positive and Gram-negative indicator strains grown in culture media with clearing zones fluctuating between 04 and 37 mm. These values were consistently higher than those reported in previous studies [33]. Accordingly, the antimicrobial effects of the LAB might be fundamentally attributed to cause cell death rather than growth inhibition. Previous findings [46] have also shown that some bacteriocin-producing *Lactobacillus* strains, although able to inhibit a variety of pathogenic bacteria, do not inhibit the growth of both *Salmonella* sp. and *Vibrio cholerae* when the effect of acid was excluded. The bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711 from Tenerife cheese was active against Gram-negative bacteria, such as *Shigella sonnei* and *Klebsiella pneumoniae* [47]. Previously, a broad spectrum of substances from *Lactobacillus reuteri* with antimicrobial activity against Gram-negative bacteria was found [48]. Generally, the strains isolated from Dhan and Zebda were highly capable to inhibit pathogen indicators. Antimicrobial activity is a desirable trait in both starter cultures and probiotic bacteria. Strains of different species of *Lactobacillus pentosus*, *Pediococcus parvulus* and *Leuconostoc pseudomesenteroides* isolated from brines

of Aloreña table olives produced antimicrobial substances which were active against a number of potentially pathogenic Gram-negative and Gram-positive bacteria, such as *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Streptococcus mutans*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella enterica* [49]. The production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk was observed [50], and also the antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* [51]. These observations were similar to the present investigation which also showed efficient antagonistic activity of LAB. Furthermore, it was observed that C1 (*Lactococcus lactis* subsp. *lactis* biovar. *diacetylactis*) inhibited the growth of *E. coli* strains and coliforms. Similar observations were made during studies on the survival of enteropathogenic *E. coli* during production of Camembert cheese [53]. It was also noted that *E. coli* 0157:H7, *L. monocytogenes* and *S. enteritidis* can grow substantially in fermented milks because they have the ability to adapt and proliferate between pH 2 and 4 [54]. A similar trend was observed with *S. enteritidis*. For example, it was previously shown that some strains of pathogenic *E. coli* could survive in both traditionally fermented milk and pasteurised milk, and multiply to high numbers [55]. The presence of enteropathogenic *E. coli* in dairy products and, particularly, in naturally fermented milk is therefore of public health significance [56, 57]. It was also reported that the acidification due to the presence of LAB in soft white cheese will not prevent the development and spread of *Listeria monocytogenes* [58].

4 CONCLUSION

In conclusion, this study showed that lactic acid bacteria (LAB) predominated the total microflora of traditionally fermented dairy products in Algeria. In general, the LAB counts obtained from MRS and M17 were different, depending on the samples analyzed and the incubation temperatures used. Generally, for the 8 samples examined, higher LAB counts were obtained at 28 °C incubation reflecting the mesophilic nature of the dairy product-associated LAB. The profile of the antimicrobial activity was tested on 3 pathogen indicators, and all 8 strains were shown to produce high inhibition zones against indicators, identified by morphological, biochemical and genomical tests as *Enterococcus* sp., *Leuconostoc* sp., *Lactobacillus* sp. and *Weissella* sp. All these species identified can contribute to the quality of Algerian traditional dairy products by acid, flavour and aroma production. The majority of isolates had antimicrobial activity, so it can be stated that LAB isolated from traditional dairy products of Algerian regions can be used as potentially probiotic bacteria with promoting host-specific health. Studies on the microbial composition and characteristics of traditionally fermented foods will provide the scientific basis for further applications. With the development of

knowledge in microbiology and biotechnology, diverse LAB have been identified from fermented foods, and their roles in fermentation process have also been evaluated. Genome sequencing and functional studies will promote novel discoveries and applications of LAB [59]. This has led to the consideration that exploration of the native LAB from Algerian traditional dairy products as potential candidates with probiotic and antimicrobial properties possibly preventing the development of pathogens deserves further studies on the characterization and identification of the antimicrobial compounds, such as bacteriocins, organic acids, diacetyl, and hydrogen peroxide, produced by selected strains. However, probiotic activity must be checked by studies of bile tolerance and gastric juice resistance. Ecological adaptation and growth characteristics of cultures in food products will determine their effectiveness for biocontrol [60]. Further research needs to focus on characterization and identification of the antimicrobial compounds produced by selected strains before their usage as starter cultures.

ACKNOWLEDGEMENTS

The genotypical characterization and antimicrobial activity were carried out under financial support from National Museum of Natural History (MNHN, Paris, France). The authors sincerely thank Prof. Sylvie Rebuffat for constant interest and fruitful discussion on the results reported. The authors would like to thank Dr. Séverine ZIRAH for the Scientific and Technical assistance and the help during manuscript preparation. We are grateful to Dr. Yanyan Li, Mr. Gérard Gastine, Mr. Christophe Goulard, Mrs. Manon Vandervennet, Mrs. Carine Lombard for invaluable technical assistance. The contribution of Mr. Massinissa Idres to the experimental work by identification of bacteria is also gratefully acknowledged.

REFERENCES

- [1] Liu, S.N., Han, Y. and Zhou Z.J. (2011). Lactic acid bacteria in traditional fermented Chinese foods. *Food Research International*, 44, 643–651.
- [2] Walstra, P., Wouters, J.T.M. and Geurts, T.J. (2006). *Dairy Science and Technology*, Second Edition. CRC Press.
- [3] Lasagno, M., Beoleito, V., Sesma, F., Raya, R., Font de Valdez, G. and Eraso, A. (2002). Selection of bacteriocin producer strains of lactic acid bacteria from a dairy environment. *New Microbiologica*, 25, 37–44.
- [4] Matilla-Sandholm, T., Mättö, J. and Saarela, M. (1999). LAB with health claim-interactions and interference with gastrointestinal flora. *International Dairy Journal*, 9, 25–35.
- [5] Françoise, L. (2010). Occurrence and role of lactic acid bacteria in seafood products. *Food Microbiology*, 27, 698–709.
- [6] Messens, W. and De V.L. (2002). Inhibitory substances produced by Lactobacilli isolated from sourdoughs—a review. *International Journal of Food Microbiology*, 72, 31–43.

- [7] Corsetti, A., Gobbetti, M. and Smacchi, E. (1996). Antibacterial activity of sourdough lactic acid bacteria: isolation of a bacteriocin-like inhibitory substance from *Lactobacillus sanfrancisco* C57. *Food Microbiology*, 13, 447–456.
- [8] Lavermicocca, P., Valerio, F., Evidente, A., Lazzaroni, S., Corsetti, A. and Gobbetti, M. (2000). Purification and characterization of novel antifungal compounds from the sourdough *Lactobacillus plantarum* strain 21B. *Applied and Environment Microbiology*, 66, 4084–4090.
- [9] Duquesne, S., Destoumieux-Garzon, D., Peduzzi, J. and Rebufat, S. (2007). Microcins, gene-encoded antibacterial peptides from enterobacteria. *Natural Products Reports*, 708–734.
- [10] Savadogo, A., Ouattara Cheik, A.T., Bassole Imael, H.N. and Traore, S.A. (2006). Bacteriocins and lactic acid bacteria – a minireview. *African Journal of Biotechnology*, 5, 678–683.
- [11] Temmerman, R., Pot, B., Huys, G. and Swings, J. (2003). Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from probiotic products. *International Journal of Food Microbiology*, 81, 1–10.
- [12] De Vuyst, L. and Degeest, B. (1999). Heteropolysaccharides from lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*, 23, 153–177.
- [13] Ostlie, H.M., Helland, M.H. and Narvhus, J.A. (2003). Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria in milk. *International Journal of Food Microbiology*, 87, 17–27.
- [14] Desmazeaud, M. (1996). Les bactéries lactiques dans l'alimentation humaine: Utilisation et innocuité. *Cahiers Agricolture*, 5, 331–343.
- [15] Jackson, M.S., Bird, A.R. and McOrist, A.L. (2002). Comparison of two selective media for the detection and enumeration of *Lactobacilli* in human faeces. *Journal of Microbiological Methods*, 51, 313–321.
- [16] De Vrese, M., Stegman, A., Richter, B., Fenselau, S., Laue, C. and Scherezemmer, J. (2001). Probiotics-compensation for lactase insufficiency. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 421S–429S.
- [17] Isolauri, E., Sutas, Y., Kankaanpää, P., Arvilommi, H. and Salminen, S. (2001). Probiotics: effects on immunity. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 73, 444S–450S.
- [18] Gibson, G.R., Saveedra, J.M., Mac Farlane, S. and Mac Farlane, G.T. (1997). Probiotics and intestinal infections In: Fuller, R. (Ed.), *Probiotic. 2: Applications and Practical Aspects*. Chapman & Hall, New York, pp. 10–39.
- [19] Ayad, E.H.E., Nashat, S., El-Sadek, N., Metwaly, H. and El-Soda M. (2004). Selection of wild lactic acid bacteria isolated from traditional Egyptian dairy products according to production and technological Criteria. *Food Microbiology*, 21, 715–725.
- [20] Boubekri, K. and Ohta, Y. (1996). Identification of lactic acid bacteria from Algerian traditional cheese, El-Klila. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 70, 501–505.
- [21] Idoui, T. and Karam, N.E. (2008). Lactic acid bacteria from Jijel's traditional butter: Isolation, identification and major technological traits. *Grasas y Aceites*, 59, 361–367.
- [22] Kacem, M. and Karam, N.E. (2006). Physicochemical and microbiological study of "shmen", a traditional butter made from camel milk in the Sahara (Algeria): isolation and identification of lactic acid bacteria and yeasts. *Grasas y Aceites*, 57, 198–204.
- [23] Apha. (1976). In: Speck, M.L. (Ed.), *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*. American Public Health Association, Washington, D. C.
- [24] De Man, J.C., Rogosa, M. and Elisabeth Sharpe, M. (1960). A medium for the cultivation of *Lactobacilli*. *Journal of Applied Bacteriology*, 23, 130–135.
- [25] Terzic-Vidojevic, A., Tolinacki, M., Nikolic, M., Lozo, J., Begovic, J., Gurban oglu Gulahmadov, S., Alekperovich Kuliev, A., Dalgalarondo, M., Chobert, J.M., Haertlé, T. and Topisirovic, L. (2009). Phenotypic and genotypic characterization of lactic acid bacteria isolated from Azerbaijani traditional dairy products. *African Journal of Biotechnology*, 8, 2576–2588.
- [26] Lore, T.A., Mbugua, S.K. and Wangoh, J. (2005). Enumeration and identification of microflora in suusac, a Kenyan traditional fermented camel milk product. *LWT - Food Science and Technology*, 38, 125–130.
- [27] Owusu-Kwarteng, J., Akabanda, F., Nielsen, D.S., Tano-Debrah, K., Glover, R.L. and Jespersen, L. (2012). Identification of lactic acid bacteria isolated during traditional fura processing in Ghana. *Food Microbiology*, 32, 72–78.
- [28] Fleming, H.P., Etchells, J.L. and Costilow, R.N. (1975). Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Applied Microbiology*, 30, 1040–1042.
- [29] Dereeper, A., Guignon, V., Blanc, G., Audic, S., Buffet, S., Chevenet, F., Dufayard, J.F., Guindon, S., Lefort, V., Lescot M., Claverie J.M. and Gascuel O. (2008). *Phylogeny.fr: robust phylogenetic analysis for the non-specialist*. *Nucleic Acids Research*, 36, W465–469.
- [30] Mennane, Z., Khedid, K., Zinedine, A., Lagzouli, M., Ouhssine, M. and Elyachioui, M. (2007). Microbial characteristics of Klila and Jben traditional Moroccan cheese from raw cow's milk. *World Journal of Dairy & Food Sciences*, 2, 23–27.
- [31] Sullivan, L.O., Rosi, R. and Phill, C. (2002). Potencial of bacteriocin lactic acid bacteria conprovements in food safety and quality. *Biochimie* 84, 593–604.
- [32] Savadogo, A., Ouattara, C.A.T., Savadogo, P.W., Ouattara, A.S., Barro, N. and Traore, A.S. (2004). Microorganisms Involved in Fulani Traditional Fermented Milk in Burkina Faso. *Pakistan Journal of Nutrition*, 3, 134–139.
- [33] Gaoui, H. and Souida, K. (2009). Study of the antimicrobial potency of lactic acid bacteria isolated from traditional dairy products in South Algeria. *State Engineer Memory*. Department of Biology, University of Amar Telidji Laghouat, Algeria.
- [34] Remeuf, F., Cossin, V., Dervin, C., Lenoir, J. and Tomasone, R. (1991). Relations entre les caractéristiques physico-chimiques des laits et leur aptitude fromagère. *Lait* 71, 397–421.
- [35] Badis, A., Guètarni, D., Moussa-Boudjema, B., Henni, D.E., Tornadijo, M.E., and Kihal, M. (2004). Identification and technological properties of lactic acid bacteria isolated from raw goat's milk of four Algerian races. *Food Microbiology*, 21, 579–588.
- [36] Terzaghi, B.E. and Sandine, W.E. (1975). Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *Applied Microbiology*, 29, 807–813.
- [37] Beresford, T. and Williams, A. (2004). The microbiology of cheese ripening In: *Cheese Chemistry, Physics and Microbiology* (Fox, McSweeney, Cogan and Guinee, Eds.), 3rd ed, Elsevier/Academic Press, Amsterdam/New York, pp. 287–318.

- [38] Hamama, A. (1997). Improvements of the manufacture of traditional fermented products in Morocco: case of Jben (Moroccan traditional fresh cheese) In: Emerging Technology Series-Food Processing Technologies for Africa (Dirar, H.a., Ed.), UNIDO, Vienna, pp. 85–102.
- [39] Cheriguene, A., Chougrani, F., Bekada, A.M.A., El Soda, M. and Bensoltane, A. (2007). Enumeration and identification of lactic microflora in Algerian goats' milk. *Afr. J. Biotech.* 6, 1854–1861.
- [40] Beukes, E.M., Bester, B.H. and Mostert, J.F. (2001). The microbiology of South African traditional fermented milks. *International Journal of Food Microbiology*, 63, 189–197.
- [41] Ouadghiri, M., Amar, M., Vancanneyt, M. and Swings, J. (2005). Biodiversity of lactic acid bacteria in Moroccan soft white cheese (Jben). *FEMS Microbiology Letters*, 251, 267–271.
- [42] Centeno, J.A., Menéndez, S. and Rodríguez-Otero, J.L. (1996). Main microbial flora present as natural starters in Cebreiro raw cow's-milk cheese (Northwest Spain). *International Journal of Food Microbiology*, 33, 307–313.
- [43] Harun-ur-Rashid, M., Togo, K., Ueda M. and Miyamoto, T. (2007). Identification and characterization of dominant lactic acid bacteria isolated from traditional fermented milk Dahi in Bangladesh. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23, 125–133.
- [44] González, L., Sandoval, H., Sacristán, N., Castro, J., Fresno, J. and Tornadajo, M. (2007). Identification of lactic acid bacteria isolated from Genestoso cheese throughout ripening and study of their antimicrobial activity. *Food Control*, 18, 716–72.
- [45] Ayad, E., Verheul, A., Jing, C., Wouters, J. and Smit, G. (2002). Antimicrobial producing wild lactococci from artisanal and non-dairy origins. *International Dairy Journal*, 12, 145–150.
- [46] Panchayuthapani, D., Abraham, J.J. and Jeyachandran, P. (1995). Inhibition of fish flora by bacteriocins of lactic acid bacteria. *Fishery Technology*, 32, 118–121.
- [47] Hernandez, D., Cardell, E. and Zarate, V. (2005). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria isolated from Tenerife cheese: initial characterization of plantaricin TF711, a bacteriocin-like substance produced by *Lactobacillus plantarum* TF711. *Journal of Applied Microbiology*, 99, 77–84.
- [48] Talarico, T.L., Casas, I.A., Chung, T.C. and Dobrogosz, W.J. (1988). Production and isolation of reuterin, a growth inhibitor produced by *Lactobacillus reuteri*. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 32, 1854–1858.
- [49] Abriouel, H., Benomar, N., Cobo, A., Caballero, N., Fernández Fuentes, M.Á., Pérez-Pulido, R. and Gálvez, A. (2012). Characterization of lactic acid bacteria from naturally-fermented Manzanilla Aloreña green table olives. *Food Microbiology*, 32, 308–316.
- [50] Røssland, E., Langsrud, T., Granum, P.E. and Sørhaug, T. (2005). Production of antimicrobial metabolites by strains of *Lactobacillus* or *Lactococcus* co-cultured with *Bacillus cereus* in milk. *Int. J. Food Microbiology*, 98, 193–200.
- [51] Koo, O.K., Eggleton, M., O'Bryan, C.A., Crandall, P.G. and Ricke, S.C. (2012). Antimicrobial activity of lactic acid bacteria against *Listeria monocytogenes* on frankfurters formulated with and without lactate/diacetate. *Meat Science*, 92, 533–537.
- [52] Gran, H.M., Wetlesen, A., Mutukumira, A.N., Rukure, G. and Narvhus, J.A. (2003). Occurrence of pathogenic bacteria in raw milk, cultured pasteurised milk and naturally soured milk produced at small scale dairies in Zimbabwe. *Food Control*, 14, 539–544.
- [53] Frank H.S. and Marth E.H. (1972). Survival of *Salmonella typhimurium* in refrigerated cultured milks. *Journal of Milk and Food Technology*, 35, 482–488.
- [54] Farber, J.M. and Peterkin, P.I. (1991). *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. *Microbiological Reviews*, 55, 476–511.
- [55] Feresu S, Nyati H. 1990. Fate of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* strains in two fermented milk products. *Journal of Applied Bacteriology*, 69, 814–821.
- [56] Frank J.K. and Marth, E.H, Olson A. (1977). Survival of enteropathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* during production of Camembert cheese. *Journal of Food Protection*, 40, 835–842.
- [57] Gilliland, S.E. and Speck, M.L. (1972). Interaction of food starter cultures and food-borne pathogens: Lactic streptococci versus Staphylococci and Salmonellae. *Journal of Milk and Food Technology*, 35, 307–310.
- [58] Benkerroum, N., Oubel, H., Zahar, M., Dlia, S. and Filali-Maltouf, A. (2000). Isolation of a bacteriocin-producing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* and application to control *Listeria monocytogenes* in Moroccan jben. *Journal of Applied Microbiology*, 89, 960–968.
- [59] Zhu, Y., Zhang, Y. and Li Y. (2009). Understanding the industrial application potential of lactic acid bacteria through genomics. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 83, 597-610.
- [60] Reina, L., Breidt, F., Fleming, H. and Kathariou, S. (2005). Isolation and selection of lactic acid bacteria as biocontrol agents for nonacidified, refrigerated pickles. *Journal of Food Science*, 70, M7–M11.

Received: January 11, 2013

Accepted: February 14, 2013

CORRESPONDING AUTHOR

Larbi Belyagoubi

Laboratoire des Produits Naturels

Département de Biologie

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et
Sciences de la Terre et de l'Univers

Université Abou Bekr Belkaïd

Tlemcen

ALGERIA

Tel.: 00213553291880

Fax: 0021343213750

E-mail: belyagoubi_larbi@yahoo.fr

ملخص

التطور المستمر لمقاومة الجراثيم للمضادات الحيوية وظهور أمراض معدية جديدة تبرز الحاجة الملحة للحصول على جزيئات جديدة مضادة للميكروبات. البيبتيدات المضادة للميكروبات هي عبارة عن جزيئات أساسية في دفاع الكائنات الحية ضد العدوان الخارجي والكائنات الحية المتنافسة. يبتوي الهدف من هذه الدراسة تحت البحث والفحص للأكتينومييسات و بكتيريا حمض اللبنيك التي لها القدرة على تركيب المواد المضادة للميكروبات. ولهذا لقد تم عزل مائة وثمانية سلالات من الأكتينومييسات (الجراثيم الشعاعية) من عينات التربة المأخوذة من مواقع مختلفة من تلمسان و الأغواط (غابات، وديان، واحات، جبال و سدود). قد صنفت السلالات الأكثر نشاطا عن طريق تفاعل البوليمراز التسلسلي بين جنس *Streptomyces* ، الذي يعتبر أهم مصدر للمضادات الحيوية. أيضا في إطار استكشاف التنوع الميكروبي للمستحضرات التقليدية للألبان الجزائرية (الجبن، الزبدة، الدهان و الكلبة) ، خضعت ما مجموعه ثمانين عينات من المزارع والمناطق للتحليل الميكروبيولوجية من أجل تحديد التنوع من بكتيريا حمض اللبنيك. عن طريق الطرق البيوكيميائية (API50 CHL) و البيولوجيا الجزيئية (ARNr 16S) ، أمكننا التعرف على عشرون سلالة و التي تنتمي إلى أجناس: *Enterococcus* (65%) ، *Leuconostoc* (21%) ، *Lactobacillus* (سلالتين) ، *Lactococcus* (سلالة) و *Weissella* (سلالة). بعد الفحص الأولي أجري إختبار النشاط مضاد للميكروبات على سلالات الأكتينومييسات و بكتيريا حمض اللبنيك ضد البكتيريا إيجابية صبغة الجرام (*Staphylococcus aureus* ، *Micrococcus luteus* ، *Bacillus cereus* و *Listeria monocytogenes*) و البكتيريا سالبة صبغة الجرام (*Pseudomonas aeruginosa* و *Escherichia coli*) وكذلك خميرة (*Candida albicans*) بواسطة طرق الإنتشار على الأوساط المغذية. البحث عن طريق تفاعل البوليمراز التسلسلي الحيوي للبيبتيدات لاسو من طرف سلالات *Streptomyces sp.* لم يعطي تضخيم الحمض النووي. كما أن محاولات إستخلاص البكتيريوسينات التي تنتجها بكتيريا حمض اللبنيك لم تؤدي إلى عزل البيبتيدات المضادة للميكروبات. تشكل البكتيريا (أكتينومييسات و بكتيريا حمض اللبنيك) مصدر هائل للجزيئات المضادة للميكروبات ذات تنوع كبير. تحتوي النظم الإيكولوجية الجزائرية على مجموعة متنوعة هامة من الكائنات الحية الدقيقة التي قد يكون لها أنشطة بيولوجية.

الكلمات المفتاحية: التربة، منتجات الألبان التقليدية، الأكتينومييسات، بكتيريا حمض اللبنيك، النشاط المضاد للجراثيم، البيبتيدات المضادة للميكروبات.

Résumé

La résistance bactérienne aux antibiotiques et l'émergence de nouvelles maladies infectieuses justifient l'urgence de disposer de nouvelles molécules antimicrobiennes. Les peptides antimicrobiens sont des molécules clés dans la défense des organismes vivants face aux agressions extérieures et aux compétiteurs.

L'objectif de ce travail s'inscrit dans le cadre de la recherche et le criblage des actinomycètes et des bactéries lactiques capables de synthétiser des substances antimicrobiennes.

Pour cela, cent huit souches d'actinomycètes ont été isolées à partir d'échantillons de sol prélevés de différents sites de Tlemcen et Laghouat (forêts, oueds, oasis, montagnes et barrage). L'identification moléculaire basée sur le séquençage du gène codant l'ARNr 16S des quarante-sept souches les plus actives de différentes origines, a permis de les rattacher au genre *Streptomyces*, souches réputées être la source la plus importante d'antibiotiques.

Aussi dans le cadre de l'exploitation de la diversité microbienne de préparations laitières traditionnelles algériennes (Jben, Zebda, Dhan et Klila), un total de 8 échantillons provenant de différentes fermes et régions ont fait l'objet d'une analyse microbiologique pour déterminer leur diversité en bactéries lactiques. Par des méthodes biochimiques (API50 CHL) et moléculaires (ARNr 16S), on a pu identifier 20 souches qui appartiennent aux genres *Enterococcus* (65%), *Leuconostoc* (21%), *Lactobacillus* (2 souches), *Lactococcus* (1 souche) et *Weissella* (1 souche).

Après un criblage initial, le test d'activité antimicrobienne a été effectué sur des souches d'actinomycètes et de bactéries lactiques contre des bactéries à coloration de Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* et *Listeria monocytogenes*), des bactéries à coloration de Gram négative (*Pseudomonas aeruginosa* et *Escherichia coli*) et une levure (*Candida albicans*) par des méthodes de diffusion sur un agar.

Les souches actives ont montré une forte activité inhibitrice vis-à-vis des microorganismes pathogènes et les diamètres des zones d'inhibition varient entre 06 et 29 mm pour les actinomycètes et entre 03 et 37 mm pour les bactéries lactiques.

La recherche par PCR des systèmes génétiques de biosynthèse des peptides lasso par des *Streptomyces sp.* n'a pas donné d'amplification d'ADN. Ainsi que des essais d'extraction de bactériocines produites par des bactéries lactiques n'ont pas abouti à l'isolement de peptides antimicrobiens.

Les bactéries (actinomycètes et bactéries lactiques) sont une source prodigieuse de molécules antimicrobiennes d'une grande diversité. Les écosystèmes Algériens abritent une variété intéressante de microorganismes qui peuvent avoir des activités biologiques.

Mots clés : Sol, Produits laitiers traditionnels, Actinomycètes, Bactéries lactiques, Activité antimicrobienne, Peptides antimicrobiens.

Abstract

Bacterial resistance to antibiotics and the emergence of new infectious diseases justifies the urgent need for new antimicrobial molecules. Antimicrobial peptides are key molecules in the defense against external aggression living and competing organisms.

The objective of this work is part of research and screening of actinomycetes and lactic acid bacteria who can synthesize antimicrobial substances.

For this, one hundred and eight strains of actinomycetes were isolated from soil samples collected from different sites in Laghouat and Tlemcen (forests, wadis, oases, mountains and dam). Molecular identification based on sequencing of the 16S rRNA gene of the forty-seven most active strains of different origins, allowed to attach to the genus *Streptomyces*, deemed to be the most important source of antibiotic strains.

Also in connection with the exploitation of the microbial diversity of traditional Algerian dairy preparations (Jben, Zebda, Dhan and Klila), a total of 8 samples from different farms and regions were subjected to microbiological analysis to determine diversity in lactic acid bacteria. By biochemical methods (API50 CHL) and molecular (16S rRNA) was able to identify 20 strains belonging to the genera *Enterococcus* (65%), *Leuconostoc* (21%), *Lactobacillus* (2 strains), *Lactococcus* (1 strain) and *Weissella* (1 strain).

After initial screening, the antimicrobial activity test was carried out on strains of lactic acid bacteria and actinomycetes against bacteria staining Gram positive (*Staphylococcus aureus*, *Micrococcus luteus*, *Bacillus cereus* and *Listeria monocytogenes*), bacteria staining Gram negative (*Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*) and yeast (*Candida albicans*) by methods of agar diffusion.

The active strains showed a strong inhibitory activity vis-à-vis pathogenic microorganisms and the diameters of the zones of inhibition ranged from 06 to 29 mm for the actinomycetes and between 03 and 37 for the lactic bacteria.

The search by polymerase chain reaction of genetic systems lasso peptides biosynthesis by *Streptomyces sp.* gave no amplification of DNA. As the extraction of bacteriocins produced by lactic acid bacteria have failed tests in isolation of antimicrobial peptides.

The bacteria (actinomycetes and lactic bacteria) are prodigious source of antimicrobial molecules of great diversity. Algerians ecosystems contain an interesting variety of microorganisms that may have biological activities.

Key words: Soil, Traditional dairy produce, Actinomycetes, Lactic acid bacteria, Antimicrobial activity, Lasso peptides.